Aus dem Pharmakologischen Institut
Direktor: Prof. Dr. med. H. Herken und der Abteilung
Pharmakologie des Institutes für Veterinär-Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. med. H. Kewitz
der Freien Universität Berlin

# Die wasserlöslichen Cholinverbindungen des Gehirnes

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Karl Dross
aus Schwersenz

1965

Aus dem Pharmakologischen Institut
Direktor: Prof. Dr. med. H. Herken

und

der Abteilung Pharmakologie des Institutes
für Veterinär-Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. med. H. Kewitz

der Freien Universität Berlin

# Die wasserlöslichen Cholinverbindungen des Gehirnes

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Karl Dross
aus Schwersenz

1. Referent: Prof. Dr. med. H. Kewitz

2. Referent: Prof. Dr. phil. G. Schenck

3. Referent: Prof. Dr. rer. nat. R. Hänsel

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 1965

Tag der Promotion: 31. Juli 1965

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS: Seite

EINLEITUNG 8

METHODIK 15

a) Tiermaterial 15

b) Verwendete Substanzen 15

c) Radiomarkierte Substanzen 17

d) Papierchromatografische Verfahren 19

e) Hochspannungselektrophorese 21

f) Säulenchromatografie 21

g) Messungen der $^{3}H$ und $^{14}C$ Radioaktivität 24

h) Cholinbestimmungen 25

i) Esterbestimmungen nach Hestrin 36

k) Bestimmung von γ-Aminobuttersäure 40

l) Phosphatbestimmung 42

m) Glycerinbestimmung 43

ERGEBNISSE 46

A) Extraktion und Bestimmung der wasserlöslichen niedermolekularen Cholinverbindungen aus dem Gehirn 46

B) Nachweis und Hydrolyse von Glycerylphosphorylcholin und Phosphorylcholin 55

1) Isolierung und Identifizierung 55

2) Hydrolyse von Glycerylphosphorylcholin und Phosphorylcholin 64

a) Verseifung von Glycerylphosphorylcholin 65

b) Verseifung von Phosphorylcholin 67

Seite

3) Quantitative Bestimmung von Glyceryl-phosphorylcholin 69

C) Chromatografie der im Rattenhirn natürlich vorkommenden Cholinester 71

D) Bestimmung von Cholin, Acetylcholin und γ-Aminobutyrylcholin durch Isotopenverdünnung 74

E) Biochemischer Abbau von γ-Aminobutyrylcholin 79

1) Verseifung von γ-Aminobutyrylcholin 79

2) Hydrolyse durch Cholinesterasen 80

a) Rattenserum 81

b) Katzenserum 83

c) Taubenserum 85

d) Taubenhirnhomogenat 89

e) Rattenhirnschnitte 89

f) Rattenhirnhomogenat 90

3) Versuche mit γ-Aminobuttersäure α-Ketoglutarsäure-Transaminase 95

F) Untersuchungen zur Synthese von γ-Aminobutyrylcholin im Mäusehirn 103

1) Radiomarkierung von γ-Aminobutyrylcholin im Gehirn nach Injektion $^{14}C$-markierter Verbindungen 104

a) Experimente mit markiertem Glutamin 104

b) Experimente mit markiertem Cholin 109

c) Experimente mit markierter γ-Aminobuttersäure 111

Seite

2) Die Synthese von γ-Aminobutyrylcholin in Hirnhomogenat 114

a) Versuche mit $^{14}$C-Glutamin 114

b) Versuche mit $^{14}$C-Cholin 117

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 122

ZUSAMMENFASSUNG 135

LITERATURVERZEICHNIS 137

EINLEITUNG

Die Entdeckung des Cholins in der Natur erfolgte 1852 durch BABO und HIRSCHBRUNN (6). Sie isolierten aus Senfsamen (Brassica nigra) den Cholinester der Sinapinsäure (β-3,5-Dimethoxy-hydroxyphenyl-acrylsäure) und gewannen daraus durch Hydrolyse Cholin. Den Ester nannten sie Sinapin und das basische Spaltprodukt Sincalin, das 10 Jahre später von STRECKER (72) in Cholin umbenannt wurde. Berichte über die pharmakologische Wirkung von Sinapin liegen nicht vor. Der Grund dafür ist wahrscheinlich seine verhältnismässig schwache Aktivität an den konventionellen Testsystemen. Dennoch kann Sinapin nicht als biologisch unwirksam bezeichnet werden, denn SCHWARZE (69) hat das Alkaloid später als den Stoff identifiziert, der den bitteren Geschmack von Rapssamen hervorruft. Die Substanz wirkt also elektiv auf die Geschmacksrezeptoren der Zunge ein und hat damit einen Angriffspunkt im sensorischen Abschnitt des Nervensystems. Jedoch wurde die grosse Bedeutung, die den Cholinestern für die Funktion des Nervensystems zukommt, erst nach der Entdeckung eines Cholinesters erkannt, der am Tier und an isolierten Organen starke und gut registrierbare Wirkungen ausübt. Dies ist der Essigsäureester des Cholins, der zunächst von HUNT und TAVEAU (38) 1911 synthetisch dargestellt und von ihnen auch schon teilweise pharmakologisch untersucht worden war. Mit Hilfe dieser hochwirksamen Verbindung, die an

bestimmten Muskeln in Bruchteilen von Mikrogramm eine Kontraktur auslöst oder am intakten Tier zur Senkung des Blutdrucks führt, hat die Physiologie und Pharmakologie in den darauffolgenden Jahrzehnten grundlegende Erkenntnisse gewonnen. Der erste Nachweis in der belebten Natur erfolgte 1914 durch DALE und EWINS, die sich die Aufgabe gestellt hatten, die Wirkstoffe von Mutterkornextrakten zu identifizieren. Sie fanden dabei auch Acetylcholin, das EWINS (22) durch Anwendung chemischer Verfahren erkannte, das aber wahrscheinlich durch die Tätigkeit von Bakterien entstanden war, wie OURY und BACQ (56) 1938 festgestellt haben. Auf Grund dieser Untersuchungen konnten FOURNEAU und PAGE (25) 1914, indem sie auf das Vorkommen von Cholin und Fettsäuren im Lecithin hinwiesen, die Vermutung äussern, dass Fettsäureester des Cholins auch im tierischen Organismus vorkommen könnten. Längst bevor DUDLY und DALE (16) 1929 die Richtigkeit dieser Vorausahnung durch den Nachweis von Acetylcholin in der Rinder- und Pferdemilz definitiv bestätigten, hatte Otto LOEWI (48) 1921 diesen Stoff für die humorale Übertragung der Vaguserregung von einem Froschherzen auf ein anderes verantwortlich gemacht und auf Grund pharmakologischer Experimente mit dem "Vagusstoff" identifiziert. LOEWI hat die damaligen Erkenntnisse in genialer Weise zu einer umfassenden Theorie vereinigt. Er kannte die Arbeiten von MAGNUS und seiner Schule, insbesondere von LE HEUX (47), die glaubten, Cholin sei das Hormon

der Darmbewegungen. Ebenso wusste er von RIESSER's Experimenten am Froschmuskel (63), aus denen hervorgeht, dass das Acetylcholin Muskelkontraktionen auslöst, auch wenn es nur mit der Endplattenregion der Muskel in Berührung kommt. Acetylcholin wurde der Kronzeuge für die Theorie von der humoralen Erregungsübertragung in den Synapsen des Nervensystems und an den Übergangsstellen von Nerven auf das Erfolgsorgan, die sich für die biochemische und pharmakologische Erforschung des Nervensystems als ungewöhnlich fruchtbar erwies. Diese Theorie war der Schlüssel zum Wirkungsmechanismus zahlreicher Pharmaka, die das periphere oder zentrale Nervensystem beeinflussen. Auf mannigfaltige Weise können die biochemischen Reaktionen des Acetylcholins und damit die Tätigkeit des cholinergischen Synapsen beeinträchtigt werden. Hemmstoffe der Cholinesterase verzögern den Abbau des Überträgerstoffes, chemisch ähnlich gebaute Moleküle verdrängen das Acetylcholin, wodurch die postsynaptischen Membranen je nach Struktur gelähmt oder erregt werden, und manche anderen Stoffe führen zur Entleerung der in den Synapsen angelegten Überträgerdepots.

Jedoch wurden in den vergangenen Jahren auch Beobachtungen gemacht, die nicht ohne weiteres mit der von LOEWI inaugurierten Theorie in Einklang stehen, so dass der Gedanke aufkam, es könnten im Nervensystem noch andere Cholinester vorhanden sein, die an bestimmten

Stellen die Rolle übernehmen, die in der Theorie nur dem Acetylcholin zugedacht war. Man könnte sich durchaus verschiedene, durch die Art der Aktionssubstanz charakterisierte Modifikationen cholinergischer Übertragungsstellen oder eine Modulation der Acetylcholinwirkung durch chemisch nahe verwandte, um den Rezeptor konkurrierende Überträgerstoffe vorstellen. Die für derartige Aufgaben in Frage kommenden Cholinester müssen nicht zwangsläufig Kontraktionen auslösen am Froschrectus, am Rückenmuskel des Blutegels oder an der glatten Muskulatur des Darmes, die zur Feststellung der biologischen Wirksamkeit meistens herangezogen werden, und häufig auch für die Fahndung nach anderen Cholinestern im Nervensystem benutzt werden. Tatsächlich fanden sich in der Tierwelt noch andere Cholinester, von denen manche keine oder nur sehr schwache Wirkungen auf Muskeln ausüben. Dadurch hat die soeben dargestellte Überlegung selbstverständlich starke Unterstützung erfahren.

Zunächst wiesen ERSPAMER und DORDONI (20), sowie ERSPAMER und BENATI (21) in Meeresweichtieren den Cholinester der Imidazolylacrylsäure (Urocaninsäure) nach, den sie Murexin nannten. In Säugetierorganen ist diese Verbindung bis heute nicht gefunden worden. Dann isolierten BANISTER, WHITTAKER und WIJESUNDRA (8) aus der Rindermilz Propionylcholin, das biologisch etwa so stark wirkt wie Acetylcholin, aber nicht in anderen

Organen vorkommt (42). Aus den Hypobranchialdrüsen von Meeresweichtieren hat WHITTAKER 1957 das Dimethylacrylylcholin (Senecioylcholin, 81) und 1959 Acrylylcholin (82) extrahiert und identifiziert.

Der einzige Cholinester, der neben Acetylcholin im Nervensystem von Warmblütern festgestellt wurde, ist das γ-Aminobutyrylcholin. Diese Verbindung haben KURIAKI, YAKUSHIJI, NORO, SHIMIZU und SAJI 1958 aus Hundehirn (46) und unabhängig davon KEWITZ 1959 aus Schweinehirn (40) isoliert. Die chemische Identität liess sich durch das Infrarotspektrum des kristallisierten Goldsalzes sicherstellen (40). Aus den Forschungen über die physiologische Bedeutung von γ-Aminobutyrylcholin ist ein Befund besonders aufschlussreich, den CURTIS, PHILLIS und WATKINS an Renshaw-Zellen des Rückenmarkes erheben konnten (15). Renshaw-Zellen sind kleine Ganglienzellen, die ihre Impulse über kollaterale Fasern der Neuriten von motorischen Vorderhornganglienzellen erhalten und in einer Art Rückkopplung die Erregbarkeit der Vorderhornganglienzellen herabsetzen. Diese Synapsen zwischen den Kollateralen der Motoneuronen und den Renshaw-Zellen sind die einzigen Nervenfasern im Zentralnervensystem, an denen einigermassen sicher erwiesen ist, dass Acetylcholin als Überträgerstoff fungiert. Hier wirkt der Cholinester der γ-Aminobuttersäure hemmend, während mehrere andere Cholinester die Wirkung von Acetylcholin imitieren.

Dieser hemmende Effekt ist auch deshalb interessant, weil er nur an der Renshaw-Zelle auftritt und nicht an der motorischen Vorderhornganglienzelle, und sich auf diese Weise von der Wirkung der γ-Aminobuttersäure unterscheidet. γ-Aminobuttersäure lähmt zwar auch die Renshaw-Zellen, aber ebenfalls die Vorderhornganglienzellen, ist also nicht so elektiv auf eine Zellart beschränkt. Die intrazerebrale Injektion von γ-Aminobutyrylcholin führt bei Mäusen zu starker motorischer Unruhe (13), was mit den Beobachtungen von CURTIS und Mitarbeitern durchaus in Einklang steht. Örtlich, an der freigelegten Hirnrinde wendeten TAKAHASHI, NAYASHIMA und KOSHINO (75) den Ester an und fanden einen gegenteiligen Effekt. Schon in kleinen Konzentrationen bewirkte er eine Herabsetzung der durch Cardiazol, Coramin oder elektrische Reizung ausgelösten Erregung. An den Synapsen des peripheren Nervensystems beobachtete BUSS (13) in Übereinstimmung mit HOLMSTEDT und SJOEQVIST (34) eine Lähmung der motorischen Endplatten und der sympathischen Ganglien nach relativ hohen Dosen von γ-Aminobutyrylcholin. Bei intraarterieller Applikation soll diese Wirkung nach einem Bericht von ASANO, NORO und KURIAKI (3) ausserordentlich gesteigert sein. Die untere Schwellendosis für eine vollständige Muskellähmung betrug 0,02 /ug. Da am Taubenmuskel eine Kontraktur ausgelöst wird (13), kann die Substanz unter die durch Depolarisation wirkenden Muskelrelaxantien eingeordnet werden. Damit steht die Hemmwir-

kung an den Streckrezeptoren von Krebsen in Einklang, die MCLENNAN (53) beschrieben hat.

Bisher ist das Bild also unvollständig und gestattet keine eindeutigen Vorstellungen von der biologischen Funktion dieses Cholinesters. Die vorgelegte Arbeit soll zusätzliche Informationen über seine Bildung und seinen Aufbau liefern.

METHODIK

a) Tiermaterial: Für die Versuche wurden Ratten, Mäuse, Tauben und Katzen verwendet.
Die Ratten stammten aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover, wo sie unter der Bezeichnung "Haubenratte $E_3$" als Inzuchtstamm gehalten werden. Dasselbe Institut lieferte auch die teilweise benutzten Sprague-Dawley Ratten.
Die zu Stoffwechselversuchen herangezogenen Mäuse waren ausgewachsene Albinobastarde im Gewicht von 20 - 30 g, die ohne feststehende Bezeichnung im Handel erhältlich sind.
Nur zu wenigen Versuchen dienten ausgewachsene Katzen und Tauben.

b) Verwendete Substanzen: Die zum Vergleich oder zum Test benötigten Reinsubstanzen wurden, soweit sie im Handel sind, fertig bezogen. Einige Stoffe mussten durch Extraktion von Gewebe, andere durch Teilsynthese gewonnen werden.
Cholinchlorid p.A. von der Firma Merck, Darmstadt.
Acetylcholinchlorid von der Deutschen Hoffmann - La Roche AG.
γ-Aminobutyrylcholin x 2HCl hat Herr Dr. Schöne von der Firma R. Reiss, Berlin, freundlicherweise hergestellt.

Phosphocholin-Chlorid, Kalzium-Salz von der California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles.

Glycerinphosphorylcholin wurde nach der Vorschrift von DAWSON (18) aus Lecithin gewonnen. 15 g Lecithin ex ovo DAB 6 [x] wurden in 40 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst und mit 315 ml Methanol und 45 ml Wasser versetzt. Durch Zusatz von 100 ml normaler methanolischer Natronlauge werden bei 37° C in 20 Minuten die Fettsäuren abgespalten, während das dabei entstehende Glycerylphosphorylcholin unter diesen Bedingungen relativ beständig ist. Zur Reinigung eignen sich Anionen- und Kationenaustauscher, weil Glycerinphosphorylcholin zu beiden nur eine sehr geringe Affinität hat. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur und Verdünnen mit 750 ml Wasser muss zunächst der Laugenüberschuss beseitigt werden. Das geschieht mit Hilfe einer Säule von 30 x 300 mm des Kationenaustauschers Amberlite IRC 50 in der H-Form. Dafür genügt die technische, grobkörnige Zubereitung. Die Säule wird mit 200 ml Wasser nachgewaschen. Nun erfolgt die Extraktion der freien Fettsäuren, indem mit gleichen Volumina Tetrachlorkohlenstoff, danach mit Äther und schliesslich mit Petroläther ausgeschüttelt wird. Nach Einengen unter reduziertem Druck auf 200 ml durch eine 400 x 30 mm Kationen-

[x] Lieferant: Chemische Fabrik Tempelhof

austauscher Säule aus Permutit ESB in der OH-Form laufen lassen und den dadurch alkalisch gewordenen Durchlauf nochmals über einen Anionenaustauscher Amberlite IRC 50 reinigen. Der mit 200 ml Nachwaschflüssigkeit vereinigte Durchlauf wird mit gleichen Volumina Petroläther, anschliessend mit Isoamylalkohol ausgeschüttelt und filtriert. Bevor mit Äther der Cholinester ausgefällt werden kann, muss die mit Ammoniak auf pH 7,5 eingestellte Lösung unter Vakuum auf 20 ml eingeengt werden. Nach nochmaligem Filtrieren bildet sich durch Zusatz von 500 ml Äther bei $-10^{\circ}$ C über Nacht ein ölig-schmieriger, gelblich gefärbter Niederschlag. Aus Äthanol kristallisiert durch Versetzen mit Kadmiumchlorid nach BAER und KATES (7) das Glycerylphosphorylcholin-Doppelsalz aus, dass durch zweimaliges Umkristallisieren aus Äthanol mit Aktivkohle gereinigt wurde. Die Analyse mit 560 µg = 114 µmol ergab 114 µmol Cholin als Acetylcholin am Froschrectus (s.u.) gemessen und 115 µmol Phosphat nach LOWRY (50) bestimmt. Die Verbindung ist damit als chemisch rein zu betrachten.

c) Radiomarkierte Substanzen:

Tritiummarkiertes Cholin mit einer spezifischen Aktivität von 33,1 mc pro mmol wurde durch Umsetzen von Dimethyläthanolamin mit $CH_2T$-jodid im Isotopenlaboratorium der Fa. Schering AG Berlin von Herrn Dr. Schulze[x] hergestellt.

$^{3}$H-markiertes Acetylcholin konnte durch Kochen mit Essigsäure/Acetanhydrid über eine Stunde am Rückflusskühler (s. S. 26f) aus $^{3}$H-markiertem Cholin gewonnen werden.

Tritiummarkiertes γ-Aminobutyrylcholin wurde nach einer Methode der Daiichi Industrial Drug Manufg. Co. (Brit. Pat. 842, 843, 27.7. 1960) aus γ-Aminobuttersäure und $^{3}$H-markiertem Cholin in Dioxan unter HCl-Gas bei 60° C synthetisiert. Durch fraktionierte Fällung mit Äther aus Methanol lässt sich γ-Aminobutyrylcholin von Cholin und γ-Aminobuttersäure trennen.

$^{14}$C-markiertes Glutamin mit einer gleichmässigen Markierung aller Kohlenstoff-Atome im Molekül stammte von der Fa. Schwarz Bioresearch Inc., Mount Vernon, N. Y., und hatte eine spezifische Aktivität von 15,7 µc/mg (2,3 mc/mmol).

$^{14}$C-markiertes Cholin trug ein markiertes Kohlenstoffatom in einer Methylgruppe. Lieferant: New England Nuclear Corp., Boston. Spezifische Aktivität: 26,5 µc/mg (3,58 mc/mmol).

$^{14}$C-markierte γ-Aminobuttersäure war ein Produkt der New England Nuclear Corp., Boston. Bei gleichmässiger Markierung des Kohlenstoffgerüstes betrug die spezifische Aktivität 26,2 µc/mg (2,7 mc/mmol).

x Herrn Dr. Schulze bin ich für die Synthese zu Dank verpflichtet

d) Papierchromatografische Verfahren:

Chromatografiepapier 2043 bM der Fa. Schleicher und Schüll wurde zur Reinigung mit normaler Schwefelsäure, darauf mit Wasser, anschliessend mit 10 normalem Ammoniak und schliesslich nochmals mit Wasser gewaschen. Es erwies sich als zweckmässig, die so gereinigten Papierbogen ausserdem mit dem jeweils verwendeten Lösungsmittel vorzuwaschen.

Trennungen im absteigenden Verfahren wurden mit folgenden Lösungsmitteln durchgeführt:

Lösungsmittel 1 (sauer): n-Butanol 6, n-Propanol 2, Äthanol 1, 80%ige Ameisensäure 1, Wasser 2 (40)

Lösungsmittel 2 (alkalisch): n-Propanol 6, 25%iger Ammoniak 1, Wasser 3 (17)

Lösungsmittel 3 (neutral): n-Propanol 4, wässrige 0,8 molare Ammonacetatlösung 1

(Diskussion der Lösungsmittel s. Ergebnisse)

Zur Entwicklung der Chromatogramme kamen folgende Farbreagenzien zur Verwendung:

Dragendorff-Reagenz: 2,6 g basisches Wismutkarbonat und 7,0 g Natriumjodid werden in 25 ml Eisessig durch Aufkochen gelöst und nach dem Abkühlen mit der fünffachen Menge Essigsäureäthylester versetzt. Durch Abfiltrieren der ausgefällten Natriumacetatkristalle erhält man die Stammlösung, die, lichtgeschützt aufbewahrt, unbegrenzt haltbar ist. Zur Verwendung ge-

lang eine Lösung, die durch Vermischen von 4 Volumteilen Stammlösung mit 5 Volumteilen Eisessig und 12 Teilen Essigsäureäthylester hergestellt wird. Mit dieser Lösung reagiert Cholin mit blauvioletter Farbe, Acetylcholin und γ-Aminobutyrylcholin mit roter Farbe, Glycerylphosphorylcholin und Phosphorylcholin geben sehr schwache gelb-braune Anfärbungen. Durch Besprühen mit Phosphatreagenz nach HANES und ISHERWOOD (s.u.) oder mit verdünnter Perchlorsäure lassen sich alle diese Färbungen wesentlich verstärken. Auf dunklem Untergrund sind Cholin, Acetylcholin und γ-Aminobutyrylcholin rot gefärbt, Phosphorylcholin und Glycerylphosphorylcholin heben sich mit brauner Farbe ab. Auf diese Weise können eine Reihe von anderen Stoffen (z.B. anorganische Kationen, Aminosäuren) sichtbar gemacht werden, da sie die durch Perchlorsäure bewirkte Schwärzung des Papiers verhindern.

Als Reagenz auf Phosphat wurde das von BANDURSKI und AXELROD abgewandelte Reagenz von HANES und ISHERWOOD (28) benutzt. Anorganisches Phosphat zeigt sich mit gelber Färbung, während organisches Phosphat nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht mit blauer Farbe angezeigt wird. Die Anfärbung von Säuren des Citratzyklus erfolgte mit 0,05%iger Bromphenolblaulösung (28). Säuren ergeben eine gelbe Färbung auf schwach blauem Hintergrund.

e) Hochspannungselektrophoretische Trennungen wurden mit einem in der Institutswerkstatt von dem Mechanikermeister POOCK hergestellten Gerät (65) vorgenommen. Bei einer Temperatur des Kühlmittels von -23° C musste die Spannung so gewählt werden, dass Anfrieren des Papiers wie auch Verdunsten des Puffers nicht auftraten. Die auf diese Weise erreichte Spannung betrug 3 kV bei 16 - 20 mA auf mit Pyridin/Eisessig-Puffer pH 3,9 getränktem Karton Macherey und Nagel 214.

f) Säulenchromatografische Trennungen mit Austauscherharzen wurden bei der Gewinnung von Glycerylphosphorylcholin benützt. Zur Reinigung der Hirnextrakte für die quantitative Bestimmung konnten Austauscherharze nicht eingesetzt werden; bei der Passage durch Kationenaustauscher wird γ-Aminobutyrylcholin vollkommen zersetzt.

Eine gute Vorreinigung der Hirnextrakte gelang auf Dextran-Gel. (Sephadex, A.B. Pharmacia, Uppsala, Schweden). Mit Hilfe quervernetzten Dextrans lassen sich Trennungen nach der Molekülgrösse vornehmen. (Zusammensetzung und Eigenschaften von "Sephadex" siehe 61). Der ungefähre Molekulargewichtsbereich in welchem Stoffgemische nach Molekülgrösse getrennt werden können, hängt von der Porengrösse des Gels und damit von dem Grad der Quervernetzung der Dextranmoleküle ab. Mit Sephadex G-25 liegt der Fraktionsbereich bei Molekü-

len vom Mol-Gewicht 100 bis 5000.

Die Abbildung 1 zeigt eine Elutionskurve von Rattenhirnextrakt dem tritiummarkiertes Cholin zugesetzt war, wie sie nach Durchlauf einer 20 x 200 mm Säule Sephadex G-25 erhalten wurde. Neben der β-Aktivität

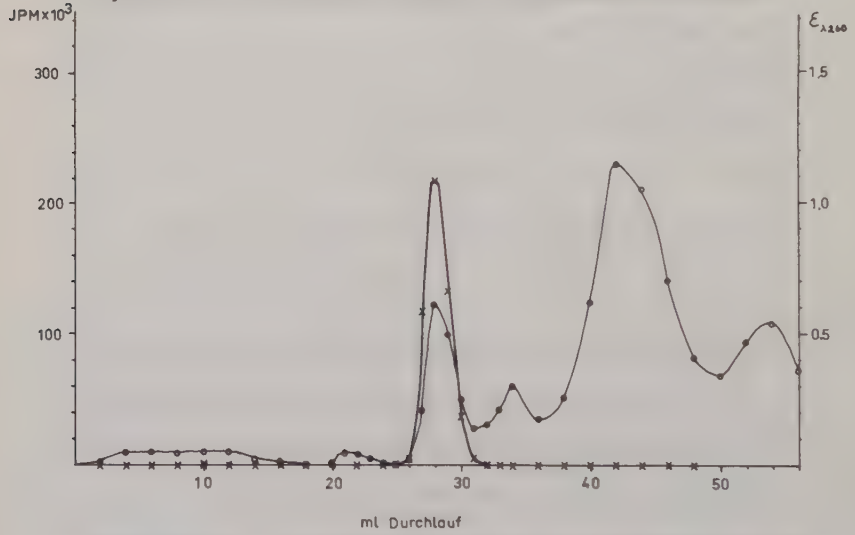



Abbildung 1. Chromatografie von Hirnextrakt auf Sephadex G-25 unter Zusatz von tritiummarkiertem Cholin
X——X Radioaktivität O——O Absorption bei 260 nm

wurde im Durchlauf die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Wellenlänge erschien vorteilhaft, weil Prostigmin, das zur Hemmung der Cholinesterase in hoher Konzentration der Extraktionsflüssigkeit zugegeben wird, bei dieser Wellenlänge am stärksten absorbiert

(Abb. 2). Nur die UV-Bande, die gleichzeitig mit dem Cholin zwischen 26 und 31 ml eluiert wird, zeigt das Prostigmin-Spektrum mit dem typischen Nebenmaximum bei 265 nm.

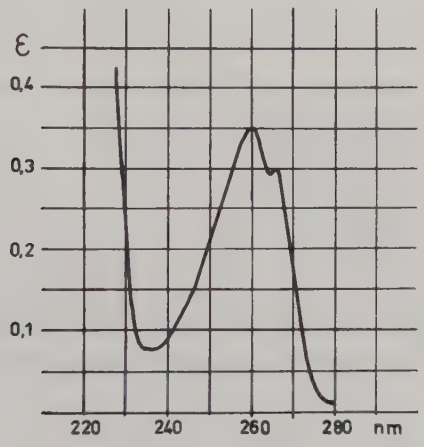



Abbildung 2. Ultraviolett-Absorptionsspektrum von Prostigmin. Beckmann-DU Spektrometer 50 µg/ml Wasser 1 cm Quarzküvette

Die übrigen im ultravioletten Bereich absorbierenden Fraktionen haben deutlich andere Spektren. Die in höchster Konzentration in der 34 ml Fraktion vorliegende Substanz hat nur ein Absorptions-Maximum bei 263 nm, Minimum bei 223 nm, Fraktion 38 - 48 ml hat das Maximum bei 248, Minimum bei 223 nm und die letzte Fraktion Maximum 250, Minimum 210.

Statt Cholin eingesetztes tritiummarkiertes Acetylcholin, wie auch γ-Aminobutyrylcholin kamen in den

gleichen Fraktionen wie Cholin gemeinsam mit Prostigmin von der Säule. Auch Glycerylphosphorylcholin ebenso wie Phosphorylcholin werden an dieser Stelle eluiert, wie eine Prüfung ergab, in der diese Phosphorsäureester dem Hirnextrakt zugesetzt waren.

g) Bestimmungen der Radioaktivität von $^{14}C$ und $^{3}H$

Zur Bestimmung der Radioaktivität der mit Tritium und Kohlenstoff-14 markierten Verbindungen stand ein "Tricarb" Flüssigkeitsszintillationszähler der Fa. Pakkard, La Grange, Ill. zur Verfügung. Als Szintillationsflüssigkeit diente eine Lösung von 4,0 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) als primärer und 50 mg 1,4-Di-(5-tolyloxazol-2-yl)-benzol (Dimethyl-POPOP) als sekundärer Szintillator in einem Liter Toluol. Die registrierte Zählrate = JPM beträgt für gelöste Stoffe bei $^{14}C$ ca. 80% und bei $^{3}H$ ca. 30% der Zerfallrate = TPM. Von wässrigen Proben wurden 0,1 ml mit 2,0 ml Äthanol oder n-Propanol und 8,0 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt. Durch die Zusätze von Wasser und Alkohol sinkt die Zählrate etwa um 30% ab. Zur Auswertung von Papierchromatogrammen können diese in schmale Querstreifen zerschnitten entweder eluiert werden oder die Streifen werden zur Messung einzeln in Szintillatorflüssigkeit gebracht. Die Zählrate beträgt bei Registrierung auf dem Papier für $^{14}C$ ca. 40 - 50%, für $^{3}H$ etwa 5 - 10% der Zerfallsrate.

h) Cholinbestimmungen:

Die zur Bestimmung von Cholin ausgearbeiteten Methoden unterscheiden sich prinzipiell nach den Registrierverfahren in solche, bei denen dafür die Reaktion mit a) einem biologischen Objekt verwendet wird und andere, bei denen b) die Reaktion mit einer chemisch reinen Verbindung gemessen wird. Als biologische Objekte kommen Mikroorganismen in Frage, die zum Wachstum Cholin benötigen. Am häufigsten wird eine cholinbedürftige Mutante von Neurospora crassa verwendet (35). Das Verfahren zeigt Mengen zwischen 1 und 10 µg Cholin/ml an. Der Pilz verwertet aber auch Cholinester, die gespalten werden können, wie z. B. Acetylcholin. Die Methode ist relativ umständlich und langwierig.

Schneller, einfacher und in 10 - 100 mal geringerer Menge lässt sich Cholin nach der Acetylierung als Acetylcholin durch die kontrahierende Wirkung auf bestimmte Muskeln quantitativ erfassen. Die Bestimmung am Musculus rectus abdominis des Frosches ergibt gut reproduzierbare Resultate und benötigt weniger Zeit als die am Blutegelmuskel. Präparation der Musculi recti abdomini erfolgt an decapitierten männlichen Wasserfröschen -Ranae Temporariae- nach Zerstörung des Rükkenmarks. Die beiden geraden Bauchmuskel werden von anhaftender Fascie befreit und in ihrer ganzen Länge in je ein geeichtes, 5 ml fassendes Glasgefäss gebracht. Für gute Durchmischung wird durch einen von unten ein-

tretenden langsamen Luftstrom gesorgt. Die Einwirkungsdauer ist auf 2 min. begrenzt und wird mit einer Stoppuhr gemessen. Nach dieser Zeit wird das registrierende Kymographion angehalten, die Testlösung abgelassen und mehrfach mit Ringerlösung gespült. Nach genau 5 min. erfolgt die Zugabe einer weiteren Probe. Die Empfindlichkeit des Muskels schwankt etwas, so dass alternierend mit der zu analysierenden Lösung stets Acetylcholineichlösung (1 /ug/ml) zugesetzt werden muss und somit jede durch eine unbekannte Acetylcholinmenge hervorgerufene Kontraktion auf den vorhergehenden und nachfolgenden Ausschlag durch eine bekannte Menge bezogen werden kann. Von jeder Probe wurden vier Parallelbestimmungen an zwei Muskeln durchgeführt. Die in den Glasgefässen befindliche Ringerlösung enthielt im Liter Wasser 6,4 g NaCl, 300 mg KCl, 170 mg CaCl, 330 mg $NaCO_3$, 700 mg Glukose, 20 mg Cholin HCl und 9 mg Eserinsulfat.

Die Acetylierung des Cholins lässt sich am leichtesten mit Essigsäureanhydrid vornehmen. Nach einstündigem Kochen am Rückflusskühler mit einer Mischung von 2 ml Essigsäureanhydrid und 10 ml Eisessig ist die Acetylierung vollständig (Tabelle 1). Das Acetylierungsgemisch muss anschliessend sorgfältig im Vakuum entfernt werden, um eine Säurekontraktion des Muskels zu vermeiden. γ-Aminobutyrylcholin wurde im Anschluss an die Hydrolyse (2 Stunden bei 1,2 atü mit normaler

Tabelle 1

Acetylierung von Cholin

| Acetylierungsgemisch | eingesetztes Cholin nMol | gefundenes Acetylcholin nMol | Abweichung % |
|---|---|---|---|
| 2 ml Acetanhydrid 10 ml Eisessig | 214 | 220 | +3 |
| 5 ml Acetanhydrid 25 ml Eisessig | 214 | 220 | +3 |

Salzsäure) acetyliert. Eine aus jedem Ansatz vor der Acetylierung abgenommene Probe diente zur Kontrolle der Einwaage durch Bestimmung der γ-Aminobuttersäure. Die in Tabelle 2 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass γ-Aminobutyrylcholin über die Umwandlung zu Acetylcholin am Musculus rectus abdominis von Rana Temporaria in sehr kleinen Mengen mit hinreichender Genauigkeit gemessen werden kann.

Tabelle 2

| Einwaage nMol | GABS nMol | Acetylcholin nMol |
|---|---|---|
| 0,16 | 0,17 | 0,15 |
| 0,27 | 0,26 | 0,27 |
| 0,24 | 0,25 | 0,23 |
| 0,32 | 0,34 | 0,34 |

Der Vorteil der biologischen Acetylcholinbestimmung am Froschrectus liegt in der Spezifität für diesen Stoff. Hingegen benötigen die chemischen oder chemisch-physikalischen Verfahren im allgemeinen bedeutend weniger Zeit. Deshalb wurden einige photometrische Methoden zur Cholinbestimmung auf ihre Genauigkeit, Spezifität und Empfindlichkeit geprüft. Im allgemeinen liegt die untere Grenze der Nachweise bei den photometrischen Methoden höher als bei den biologischen, sodass stets eine Steigerung der Empfindlichkeit angestrebt werden musste.

Bestimmung von Cholin als Enneajodid nach Appleton et al. (2)

Das Verfahren beruht auf der Schwerlöslichkeit des Enneajodidkomplexes von Cholin. 0,5 ml wässrige Cholinlösung werden bei +4° C mit 0,2 ml Jodjodkaliumlösung versetzt, die aus 15,7 g Jod und 20,0 g Kaliumjodid, Wasser ad 100,0 ml hergestellt wurde. Nach 20 min. bei 4° C setzen sich durch 10 min. Zentrifugieren mit 2500 U/min violettbraune Kristalle am Boden ab. Mit Hilfe einer zur Kapillare ausgezogenen Pipette wird die überstehende Lösung abgesaugt. Der Niederschlag ist danach fast trocken und kann in 10 ml Äthylendichlorid (Dichloräthan) gelöst, gemessen werden. Das Absorptionsspektrum dieser Lösung hat bei 295 nm und bei 365 nm je ein Maximum. Die Wellenlänge 365 nm wird für die Messung von Cholinenneajodid benutzt,

weil dort eventuell mitgerissenes Jod weniger stört. Messungen einer auf diese Weise hergestellten Eichreihe in der 1 cm Küvette im Beckmann DU-Spektrophotometer zeigt Abbildung 3.

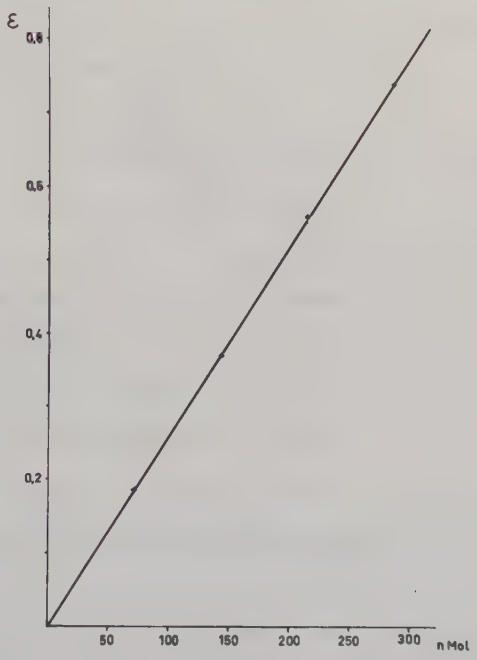



Abbildung 3.
Cholineichkurve mit der Methode nach Appleton et al.

Cholinenneajodid-Methode abgewandet nach M. HAYASHI et al. (29)

Bei dieser Abwandlung der Methode nach APPLETON et al. wird Cholinenneajodid in Dichloräthan übergeschüttelt, während das überschüssige Jod als KJ x $J_2$ in Acetatpuffer von pH 5,0 zurückbleibt. Die spektrophotometrische Messung erfolgt wie oben angegeben.

Reagenzien:

0,5 molarer Acetatpuffer pH 5,0

(zu 10,0 ml 2 normaler Essigsäure werden

10,0 ml normale Natronlauge gegeben, die Lösung auf 100,0 ml aufgefüllt)

0,1 molare Kaliumjodidlösung

0,5% Jodlösung in Dichloräthan

Verfahren:

Zu 1,0 ml wässriger Probelösung werden 0,2 ml Acetatpuffer und 0,1 ml Kaliumjodid gegeben und die Mischung mit 4,0 ml Jodreagenz kräftig durchgeschüttelt. Man zentrifugiert, entfernt die wässrige Phase und misst die Dichloräthanphase bei 335 nm gegen 4,0 ml Dichloräthan, das mit 1,0 ml Wasser, 0,2 ml Puffer und 0,1 ml Kaliumjodidlösung geschüttelt wurde, als Leerwert.

Nach der gleichen Vorschrift lässt sich auch Acetylcholin bestimmen, dessen Enneajodid den gleichen molaren Extinktionskoeffizienten hat wie Cholin. Bei γ-Aminobutyrylcholin dagegen ergibt sich keine lineare Beziehung zwischen der Konzentration und der Absorption. Phosphorylcholin und Glycerylphosphorylcholin werden mit der Methode nicht erfasst. Wegen zu grosser Streuung der Leerwerte, die auch durch Anwendung sorgfältig gereinigter Reagenzien nicht verringert werden konnte, war die Bestimmung nur bedingt brauchbar, Eichkurven für Cholin zeigt Abbildung 4.

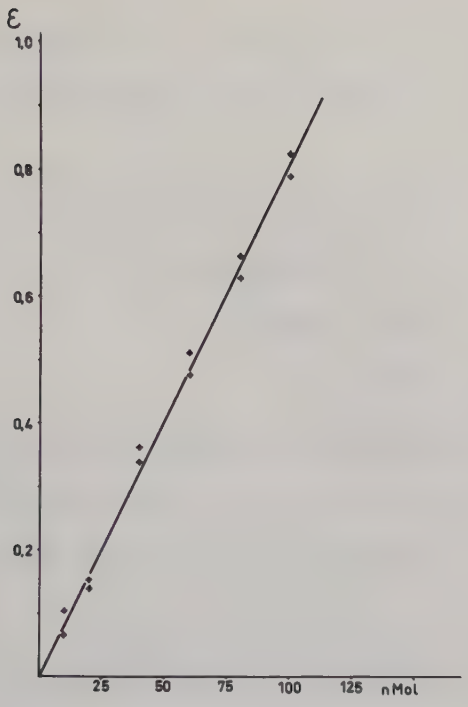



Abbildung 4. Doppeleichreihe Cholin in der Bestimmung nach HAYASHI et al.

Reineckat-Fällung des Cholins nach O. KRAUPP und G. PAUMGARTNER (45)

Cholinreineckat ist sehr schlecht wasserlöslich und deshalb häufig zur gravimetrischen Bestimmung von Cholin verwendet worden. Da der Komplex jedoch in Aceton gut löslich ist, kann seine Konzentration auch kolorimetrisch ermittelt werden (Ausführliche Diskussion 39). KRAUPP und PAUMGARTNER führen die Fällungsreaktion

auf Chromatografiepapier aus. Dadurch wird die Löslichkeit noch mehr vermindert und das überschüssige Ammoniumreineckat kann besser ausgewaschen werden.

Reagenzien:

2%ige Ammoniumreineckatlösung in Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,6; frisch bereitet

Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,6 1 : 2 mit Wasser verdünnt

Aceton p.A.

Verfahren:

Trockene, Cholin enthaltende Papierstreifen werden für 14 Stunden in Ammoniumreineckatlösung gelegt. Die Papiere werden dann zweimal hintereinander 60 sek. durch vorsichtiges Schwenken in jeweils frischer Pufferlösung von überschüssigem Ammoniumreineckat befreit und getrocknet. Die Extraktion des Cholinreineckats erfolgt durch halbstündiges Schütteln mit 4,0 ml Aceton in Schliffgläsern. Die Extinktion wird im ultravioletten Spektralbereich bei 327 nm gemessen. Eine Eichreihe zeigt Abbildung 5.

Da die untere Erfassunsgrenze dieser Methode bei 15 nMol liegt, konnte sie zur quantitativen Bestimmung von Acetylcholin und γ-Aminobutyrylcholin im Rattenhirn nicht herangezogen werden.

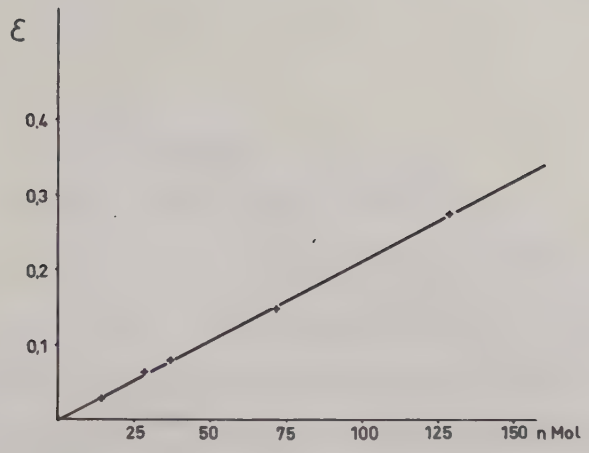



Abbildung 5. Cholin in der Bestimmung nach KRAUPP

Reaktion mit cis-Aconitinsäureanhydrid nach BÖTTCHER et al. (12)

Tertiäre Amine und quaternäre Ammoniumbasen geben bei Erwärmung mit cis-Aconitinsäureanhydrid in wasserfreien Lösungsmitteln einen Farbkomplex. Die Färbung ist abhängig von der Temperatur und der Dauer der Erwärmung. Sie geht von dunkelrot über violett nach grün.

Reagenzien:

125 mg cis-Aconitinsäureanhydrid werden in 20 ml Essigsäureanhydrid gelöst und mit Toluol auf 50 ml aufgefüllt. Vor dem Gebrauch sollte das Reagenz mindestens 24 Stunden stehen.

Verfahren:

Der in 2,0 ml Toluol/Essigsäureanhydrid (1 : 1) gelösten Probe wird 1,0 ml Reagenzlösung zugefügt und die Mischung 12 min. bei 140° C im Trockenschrank erhitzt. Nach dem Abkühlen wird bei 610 nm gegen einen Leerwert, der gleich behandelt wurde, gemessen. Die Ergebnisse einer Bestimmung mit reinem Cholin zeigt Abbildung 6.

Acetylcholin und γ-Aminobutyrylcholin geben die Farbreaktion auch und können gleichfalls mit dieser Methode bestimmt werden. Die molare Extinktion für γ-Aminobutyrylcholin ist allerdings geringer als die von Cholin und Acetylcholin.

Ein Versuch, die Empfindlichkeit der Bestimmung durch Messungen bei grösserer Schichtdicke (5 cm Küvetten) zu erhöhen, scheiterte daran, dass die Extinktion der Leerwerte zu hoch wurde. Messungen in dem Bereich $\varepsilon > 1{,}000$ werden so ungenau, dass kleinere Extinktionsunterschiede nicht mehr exakt genug erfasst werden können.

Dipikrylaminmethode nach SCHILL (39)

Dipikrylamin (2,2',4,4',6,6'-Hexanitrodiphenylamin) gibt in wässriger Lösung mit vielen organischen Basen unlösliche Komplexe, die sich in Aceton und Chloroform lösen (Diskussion s. 39). Ein für Propanthelin (Xanthen-9-carbonsäure-2-diisopropylaminoäthylestermetho-

bromid) beschriebenes Verfahren, konnte so abgeändert werden, dass es noch 2 nMol Cholin mit genügender Genauigkeit erfasst.

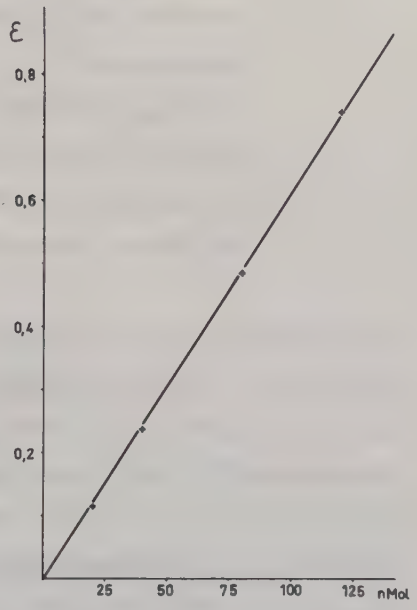



Abbildung 6.
Eichkurve für Cholinchlorid in der Bestimmung nach BÖTTCHER et al.

Reagenzien:

Dipikrylaminlösung (1,0 mg in 100,0 ml Dichlormethan)

0,1 ml normale Natronlauge

25,0 mg Tetrabutylammoniumjodid in 1,0 ml Dichlormethan

Verfahren:

Die wässrige Probelösung wird mit 0,1 ml Natronlauge versetzt und mit Wasser auf

0,5 ml gebracht. Nach Zusatz von 3,0 ml Dipikrylaminlösung 5 min. schütteln und durch Zentrifugieren die Phasen voneinander trennen. 2,0 ml der organischen Phase entnehmen und 0,1 ml einer ganz frisch bereiteten Lösung von 25 mg Tetrabutylammoniumjodid in 1,0 ml Dichlormethan zusetzen. Die Messung erfolgt bei 420 nm in der 5 cm Mikrorohrküvette in der Mikroeinrichtung zum PMQ II Spektrometer der Fa. Zeiss, Oberkochen.

In Abbildung 7 ist eine Eichreihe mit Cholin grafisch dargestellt. Acetylcholin und γ-Aminobutyrylcholin geben die Reaktion mit gleicher molarer Extinktion, Phosphorylcholin und Glycerylphosphorylcholin reagieren nicht mit Dipikrylamin. Der Nachteil der Methode liegt in ihrer geringen Spezifität; sehr viele Amine können mit gleicher molarer Extinktion gemessen werden, so Prostigmin, Spermidin, Spermin, die ebenfalls in den benutzten Extrakten enthalten sind. Putrescin gibt geringere molare Extinktionen.

1) Esterbestimmungen nach HESTRIN

Esterbestimmungen mit der Hydroxamsäuremethode nach HESTRIN (32)

Ester organischer Säuren vermögen im alkalischen Milieu mit Hydroxylamin Hydroxamsäuren zu bilden, de-

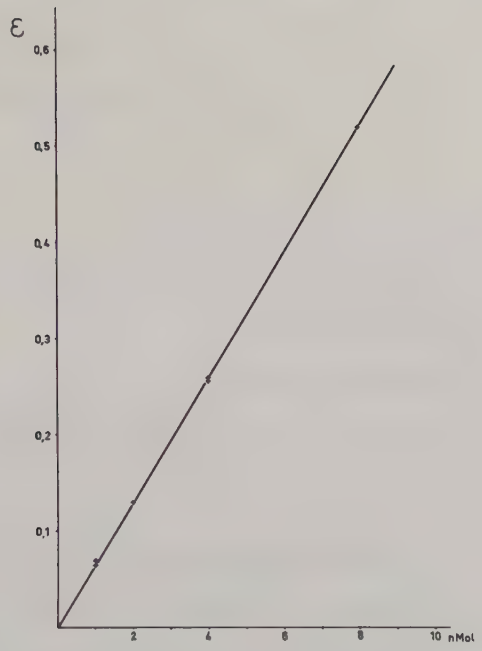



Abbildung 7. Doppelbestimmung von Cholin mit der Dipikrylaminmethode 5 cm Mikrorohrküvette

ren Eisen-III-Komplexe gelbbraun gefärbt sind. Diese Färbung kann nach HESTRIN zur quantitativen Bestimmung von Fettsäurecholinestern benutzt werden. Nach KEWITZ (41) lässt sich unter veränderten Bedingungn auch γ-Aminobutyrylcholin mit dieser Methode bestimmen. Während sich die Bildung von Hydroxamsäuren bei Fettsäureestern, wie Acetylcholin und Butyrylcholin, in wenigen Minuten im stark alkalischen vollzieht, geht

die Reaktion bei Aminosäureestern, wie γ-Aminobutyrylcholin in der Nähe des Neutralpunktes bei pH 7 - 8 vor sich und verläuft wesentlich langsamer. Die Umsetzung ist erst nach 14 Stunden bei Raumtemperatur beendet.

Reagenzien:

12,5%ige Hydroxylaminlösung in 0,01 molarem Trispuffer pH 7,6 (frisch bereitet)
normale Natronlauge
7 normale Salzsäure
1,74 molare Eisen-II-chloridlösung in 0,1 normaler Salzsäure

Verfahren:

2,0 ml Untersuchungslösung werden mit 1,0 ml Hydroxylaminlösung und 0,5 ml Natronlauge vermischt. Nach 120 sek. erfolgt Zugabe von 0,25 ml Salzsäure und 0,25 ml Eisenchloridlösung. Das Absorptionsmaximum liegt bei 510 nm.

Eine Bestimmung mit reinem Acetylcholin zeigt Abbildung 8.

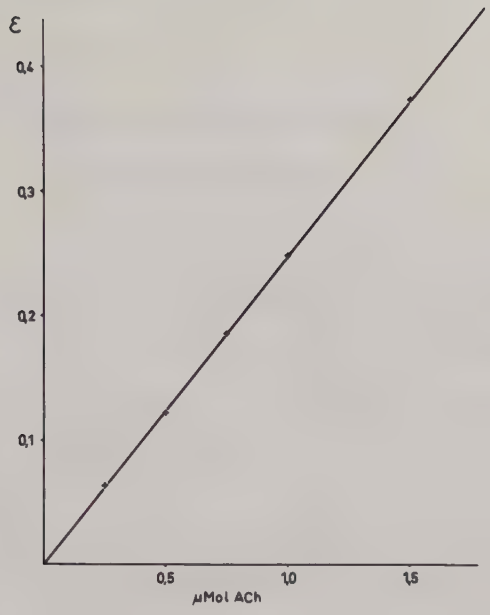



Abbildung 8. Eichreihe Acetylcholin in der Hestrinmethode

Modifizierte Hestrinmethode zur Bestimmung von γ-Aminobutyrylcholin

Reagenzien:

Wie für Hestrinmethode (s.o.)

Verfahren:

Zu der Mischung von 2,0 ml Untersuchungslösung, die auf pH 7,2 eingestellt ist, und 1,0 ml Hydroxylaminlösung werden nach 14-stündigem Stehen bei Raumtemperatur

0,5 ml Natronlauge, 0,25 ml Salzsäure und 0,25 ml Eisenchloridlösung gegeben. Das Absorptionsmaximum ist auch hier 510 nm, die molare Extinktion ist etwas geringer als die von Acetylcholin.

In Abbildung 9 ist die Abhängigkeit der Extinktion von der γ-Aminobutyrylcholin-Konzentration grafisch dargestellt.

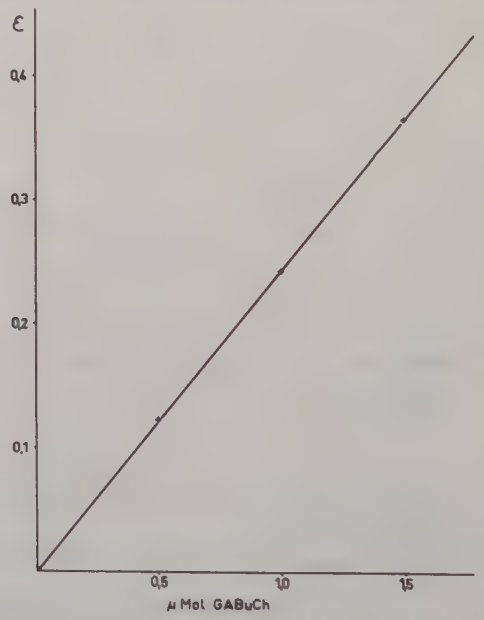



Abbildung 9.
γ-Aminobutyrylcholin in der modifizierten Hestrinbestimmung

k) Bestimmung von γ-Aminobuttersäure

Beim Erwärmen von alkalischer γ-Aminobuttersäurelösung mit Glutaminsäure und Ninhydrinreagenz entstehen fluoreszierende Substanzen unbekannter Zusammensetzung. LOWE et al. (49) entwickelten auf dieser Grundlage eine

quantitative Bestimmung. Der Zusatz von zweiwertigen Kupferionen stabilisiert den fluoreszierenden Stoff.

Reagenzien:

18%ige Glutaminsäurelösung in Karbonatpuffer pH 9,4

0,14 molare Ninhydrinlösung in Karbonatpuffer pH 9,4

Kupfertartratlösung: 1,6 g Natriumkarbonat, 329 mg Weinsäure und 300 mg Kupfersulfat ($CuSO_4$ x 6 $H_2O$) werden auf einen Liter Wasser gelöst.

Verfahren:

Die Mischung von 1,0 ml Probelösung und je 0,1 ml Glutaminsäure und Ninhydrinlösung wird für 30 min. bei 60° C im Wasserbad gehalten. Die Messung der abgekühlten, mit Kupfertartratlösung auf 25,0 ml aufgefüllten Lösung erfolgt in einem Spektrofluorometer. Die Wellenlänge der aktivierenden Strahlung beträgt 380 nm, die der emittierenden 470 nm.

Abbildung 10 zeigt eine Eichkurve für γ-Aminobuttersäure, die unter den genannten Bedingungen im Aminco-Spektrofluorometer (1cm Quarzküvette) aufgenommen wurde.

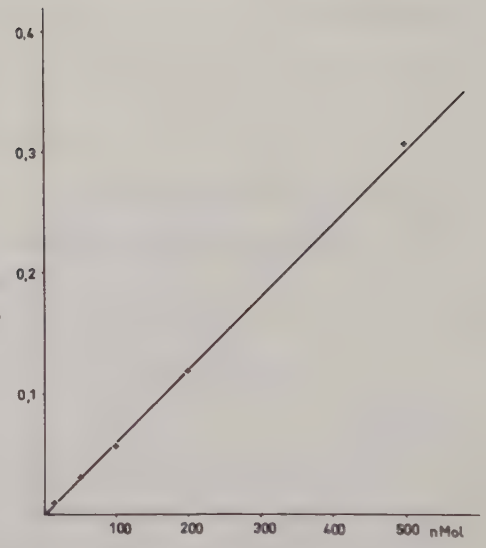



Abbildung 10.

Eichreihe γ-Aminobuttersäure in der Methode nach LOWE et al.

1) Phosphatbestimmung nach BERENBLUM und CHAIN (10)

Diese Phosphatbestimmung beruht wie die meisten photometrischen Messungen des Phosphates auf der Abtrennung des Anions als Phosphormolybdänsäure und nachfolgender Reduktion zu Molybdänblau. (Diskussion von Phosphatbestimmungen s. 33).

Reagenzien:

10 normale Schwefelsäure

5%ige Ammoniummolybdat-Lösung

0,2%ige Zinn-II-chloridlösung in normaler Schwefelsäure (aus einer 40%igen Lösung in konzentrierter Salzsäure stets frisch zubereiten)

Isobutanol p.A.

Äthanol, absolut

Verfahren:

Zu 1,0 ml Untersuchungslösung werden 2,5 ml Ammoniummolybdatlösung gegeben und nach Zusatz von 1,0 ml 10 normaler Schwefelsäure mit Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt. Die gebildete Phosphormolybdänsäure lässt sich durch einminütiges Schütteln mit 10,0 ml Isobutanol extrahieren. Zur Entfernung von mitgerissenem Ammoniummolybdat dient zweimaliges Ausschütteln mit 5,0 ml normaler Schwefelsäure. Durch Reduktion mit 15 ml Zinn-II-chloridlösung tritt Farbstoffbildung ein. Die mit Äthanol auf 25,0 ml aufgefüllte Isobutanolphase wird bei 725 nm gegen einen gleich behandelten Leerwert gemessen.

Die molare Extinktion beträgt $\varepsilon = 750$. Durch Verringerung der Volumina um ein Fünftel lässt sich die Empfindlichkeit um das Fünffache steigern. In diesem Falle müssen zum Ausschütteln Schliffstopfengläser statt der Scheidetrichter verwendet werden.

Glycerinbestimmung (in Anlehnung an VORIS et al (79)

In saurer Lösung vermag Perjodat mehrwertige Alkohole zu oxydieren, wobei es zu Jodat reduziert wird. Im

pH-Bereich zwischen 4,4 - 7,0 lässt sich Perjodat neben Jodat jodometrisch titrieren. VORIS et al. benutzen diese Reaktion für eine quantitative Bestimmung von Glycerin. Diese Methode lässt sich empfindlicher gestalten, wenn die Rücktritation von Jod mit Natriumthiosulfat durch eine photometrische Messung des Jods ersetzt wird.

Reagenzien:

Perjodat-Lösung (625 mg Kaliumperjodat werden in 500,0 ml normaler Schwefelsäure gelöst)

15%ige Magnesiumsulfat-Lösung

normale Natronlauge

0,1 normale Schwefelsäure

Sörensen-Phosphatpuffer pH 5,7

1%ige Kaliumjodidlösung

Chloroform p.A.

Verfahren:

Die Untersuchungslösung wird mit 0,2 ml Perjodatlösung versetzt, mit Wasser auf 2,0 ml aufgefüllt und 30 min. in einem Wasserbad auf 60° C erwärmt. Nach Zusatz eines Tropfens Magnesiumsulfatlösung erfolgt Neutralisation mit Natronlauge bis zur Bildung von Magnesiumhydroxyd, das durch einige Tropfen Schwefelsäure wieder gelöst wird. Aus der mit 0,5 ml Sörensen-Puffer auf pH 5,7 gebrachten und mit 0,2 ml Ka-

liumjodidlösung versetzten Lösung lässt sich Jod mit 4,0 ml Chloroform in 5 min. ausschütteln. Die Extinktionsabnahme bei 510 nm, gegen einen gleichbehandelten Leerwert gemessen, ist in Abbildung 11 dargestellt.

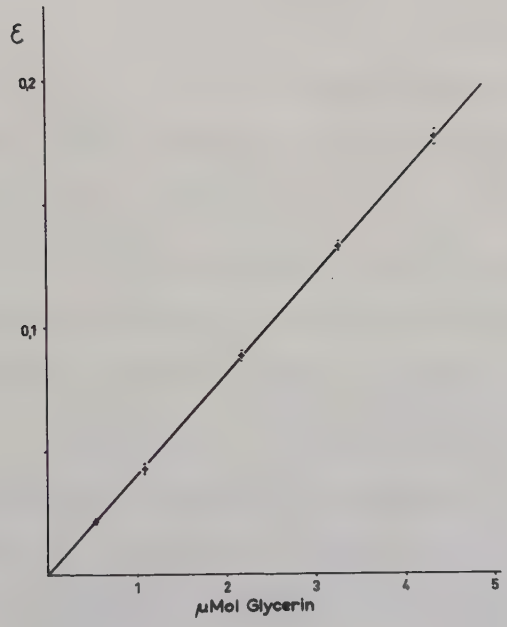



Abbildung 11. Photometrische Titration von Jodat zur Glycerinbestimmung

ERGEBNISSE

A) Extraktion und Bestimmung der wasserlöslichen niedermolekularen Cholinverbindungen aus dem Gehirn

Ausgangspunkt für das Studium des Stoffwechsels und der Bedeutung von γ-Aminobutyrylcholin im Zentralnervensystem sollten Bestimmungen der Konzentration des Esters im Hirngewebe sein. Durch gleichzeitige quantitative Analyse von Acetylcholin und von freiem Cholin war beabsichtigt, einen Überblick über den Umsatz der niedermolekularen Cholinverbindungen bei verschiedenen Funktionszuständen des Gehirns zu erlangen. Die bisher publizierten Untersuchungen betreffen nur das Acetylcholin, das durch seine hohe biologische Wirksamkeit an verschiedenen muskulären Organen auch in ziemlich rohen Extrakten leicht erfasst werden kann. Jedoch erschien es wünschenswert, Cholin und einzelne cholinhaltige Verbindungen zu isolieren und von jedem dieser Stoffe die Konzentration festzustellen. Als einfachstes Trennverfahren für diese Analyse wurde die Papierchromatografie nach schonend durchgeführter Extraktion gewählt.

Vielfältige Vorversuche galten der Ermittlung einer Extraktionsmethode, bei der die relativ labilen Ester möglichst vollständig erhalten und die Mengen an Be-

gleitstoffen klein sein sollten. Bei dem ersten brauchbaren Verfahren wurde das Gewebe sofort nach der Entnahme aus dem Tier mit einem Pistill an der Wandung eines auf tiefe Temperatur gebrachten Glaskolbens zerquetscht, dünn ausgestrichen und dadurch eingefroren. Zur Tiefkühlung diente feste Kohlensäure in Aceton oder Alkohol. Im Vakuum über zwei Kühlfallen erfolgte die Trocknung. Dadurch entstand ein etwas klebriger, hygroskopischer Geweberückstand, der sich von dem als Extraktionsmittel zugesetzten Alkohol schlecht abtrennen liess. Deshalb wurde das Gewebe nach der Gefriertrocknung und dem Wiegen zur Entfernung des noch vorhandenen Wassers mit trockenem Natriumsulfat verrieben und dann viermal mit je 3 ml Methanol extrahiert, der über eine G 4 Glasfritte abgesaugt werden konnte. Am Rotationsverdampfer erfolgte bei Zimmertemperatur und geringem Unterdruck die Entfernung des Methanols. Beim Lösen in 1 ml $10^{-4}$ normaler Salzsäure blieb ein fast weisser Rückstand übrig. Zur weiteren Reinigung wurde der Extrakt dann dreimal mit je 3 ml eines Gemisches aus Heptan und Isoamylalkohol im Verhältnis 1 : 3 ausgeschüttelt.

Die quantitative Bestimmung von Cholin und Acetylcholin erfolgte über das Enneajodid mit der Methode nach Appleton et al. (s. S. 28). Zur Erfassung der γ-Aminobutyrylcholin (GABuCh)-Menge wurde nach Hydro-

lyse Cholin und γ-Aminobuttersäure bestimmt. Die Ergebnisse von Hydrolyseexperimenten sind in Abbildung 12 dargestellt. Der Ester hydrolysiert in 1 normaler

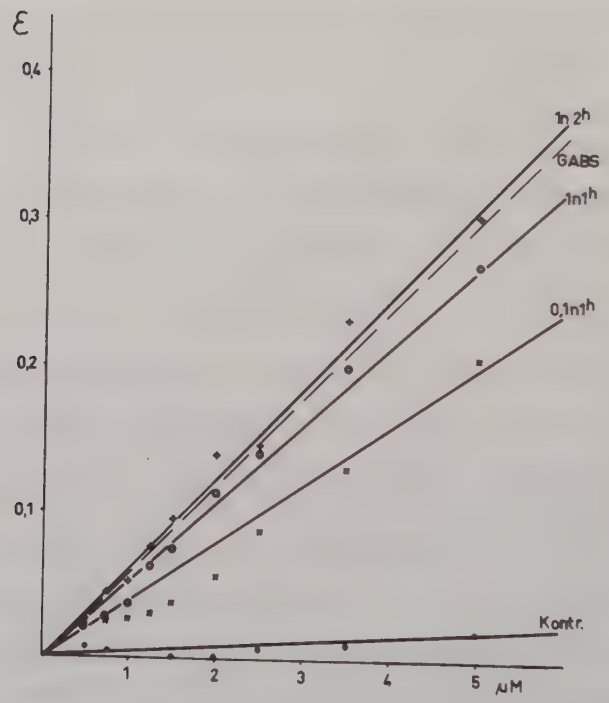



Abbildung 12. Hydrolyse von GABuCh im Autoklaven bei 1,2 atü

•———• ohne Behandlung x——x 0,1 n HCl $1^h$
o———o n HCl $1^h$ +——+ n HCl $2^h$
------- GABS-Eichkurve (s. Abb. 10)

Salzsäure bei 1,2 atü in 2 Stunden vollständig. Nach einer Stunde sind erst 90% gespalten und in 0,1 nor-

maler Salzsäure nur 75%.

Das Verfahren war bezüglich der Erfassung von Acetylcholin befriedigend. Der Mittelwert aus 13 Versuchen betrug 2,5 $\pm$ 1,9 /ug pro Gramm Frischgewicht. Dieser Wert entspricht denen, die auch von anderen Untersuchern gefunden wurden. Störend ist selbstverständlich die relativ grosse Streuung. Ausserdem ist der Arbeitsgang etwas umständlich, wodurch die Abweichungen z. T. bedingt sind.

Ein ganz anderer Gesichtspunkt stellte sich bei der GABuCh-Bestimmung heraus. Hier hätten die Cholin- und die γ-Aminobuttersäure (GABS)-Bestimmung gleiche molare Mengen ergeben müssen. Statt desses fanden sich aber Abweichungen bis zu 25%, die durch Ungenauigkeiten nicht erklärt werden konnten und den Analysenmethoden nicht anhaften. Deshalb wurde der Extraktionsgang geändert und von der Hydrolyse des GABuCh in Salzsäure zu der Spaltung in Ammoniak übergegangen. Das Gewebe kam in Zentrifugengläser mit Glasschliffstopfen, die 2 ml Wasser und 5 ml eines Gemisches von 1 Teil Heptan und 2 Teilen Isoamylalkohol enthielten und auf ca. -70° C in $CO_2$/Aceton abgekühlt worden waren. Die wässrige Phase enthielt 20 mg Harnstoff zur Sprengung etwaiger Wasserstoffbrückenbindungen, 0,2 ml normale Essigsäure und 9 x $10^{-5}$ Mol Prostigmin je Liter zur Hemmung der im Gewebe enthaltenen Cholin-

esterase. Das Gehirn war sofort gefroren, taute aber beim Stehen an der Luft allmählich auf. Im halbgefrorenen Zustand wurde homogenisiert, dann 20 min. geschüttelt und anschliessend zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Nach Entnahme der wässrigen Phase wird nochmals mit 2 ml Wasser geschüttelt und das nach Zentrifugieren entnommene Wasser der ersten Fraktion zugefügt. Nun folgt die Entfernung der organischen Lösungsmittelreste durch Ausschütteln mit Äther, der dann im Luftstrom ausgetrieben wird. Nach der Gefriertrocknung und anschliessender Papierchromatografie ist der Aufarbeitungsgang beendet. Die Hydrolyse des GABuCh's erfolgt in 0,1 normalem Ammoniak in 2 Stunden bei 37° C. Dabei wird GABuCh vollständig gespalten. Die zusätzliche Hydrolyse in normaler Salzsäure für 2 Stunden bei 1,2 atü setzt jedoch weiteres Cholin frei. Aus diesem Grunde wurde angenommen, dass der Extrakt einen weiteren, viel stabileren "Cholinester X" enthält, dessen Struktur aufgeklärt werden musste. Mit dieser Aufgabe beschäftigen sich die nächsten Untersuchungen. Die Ausbeute des Extraktionsverfahrens betrug für Acetylcholin in 7 Versuchen 93 - 103%, für GABuCh in 10 Versuchen 92 - 102% (Tabelle 3). In acht Versuchen mit Rattenhirn (Gewicht der Ratten zwischen 120 - 140 g) fanden sich 14,4 ± 1,4 nMol, d.h. 2,68 ± 0,25 µg Acetylcholin pro g Frischgewicht und in dem GABuCh-Areal 35 ± 4,4 nMol, das sind 24,6 ± 2,1 µg GABuCh pro g Frischgewicht sowie 495 ± 76 nMol Cholin-

ester X. Die GABuCh-Werte sind, wie sich später herausstellte, viel zu hoch, was darauf zurückzuführen ist, dass Cholinester X beim Kochen mit Essigsäureanhydrid durch Umesterung Acetylcholin liefert. Darauf wird später noch näher eingegangen.

| Zugesetzter Ester | ohne Zusatz | Zusatz | mit Zusatz | % wieder gefunden |
|---|---|---|---|---|
| Acetyl- | 14,0 g | 10,0 g | 24,0 g | 100 |
| cholin | 15,0 g | 10,0 g | 25,7 g | 103 |
| | 14,8 g | 10,0 g | 24,0 g | 97 |
| | 14,8 g | 10,0 g | 23,8 g | 96 |
| | 4,6 g | 10,0 g | 14,0 g | 96 |
| | 9,6 g | 10,0 g | 19,2 g | 98 |
| | 4,1 g | 10,0 g | 13,1 g | 93 |
| γ-Amino- | 50,0 g | 9,1 g | 60,0 g | 101,5 |
| butyryl- | 60,0 g | 9,1 g | 70,0 g | 101 |
| cholin | 140,0 g | 9,1 g | 150,0 g | 100,5 |
| | 9,4 g | 9,1 g | 18,3 g | 99 |
| | 10,0 g | 10,4 g | 20,0 g | 98 |
| | 16,0 g | 10,4 g | 25,0 g | 95 |
| | 33,0 g | 10,4 g | 40,0 g | 92 |
| | 24,0 g | 10,4 g | 44,0 g | 99 |
| | 24,0 g | 11,8 g | 36,0 g | 100,5 |
| | 28,0 g | 11,8 g | 40,0 g | 100,5 |

Tabelle 3. Prüfung des Extraktionsverfahrens durch Zusatz von Reinsubstanzen zum Extraktionsmaterial

Zunächst erschien es wichtig zu ermitteln, ob der hergestellte Hirnextrakt noch weitere niedermolekulare

Cholinverbindungen enthält. Gleichzeitig wurde damit geprüft, ob Cholin und Acetylcholin bei der Papierchromatografie nur je eine Fraktion bilden oder, vielleicht durch Adsorption bedingt, an verschiedenen Stellen der Papierstreifen zu finden sind.

Ein Rattenhirn wurde mit dem angegebenen Verfahren extrahiert, der Extrakt lyophilisiert und der trockene Rückstand mit 1,0 ml Äthanol ausgezogen. Davon wurden 3 gleiche Teile, die je einem Viertel des Extraktes entsprachen, abgenommen und jeder auf einen Fleck zur Papierchromatografie aufgetragen. Zur Orientierung über die $R_f$-Werte diente eine auf dem gleichen Bogen mitlaufende Mischung von 20 µg Cholin, 20 µg Acetylcholin und 20 µg γ-Aminobutyrylcholin. Nach der Auftrennung in Lösungsmittel 1 ergab die Dragendorff-Anfärbung, die an einem der erhaltenen Streifen vorgenommen wurde, einen deutlichen Nachweis für Cholin. Nach Besprühen mit Perchlorsäure waren auch Acetylcholin und GABuCh auf dem Chromatogramm sichtbar. Die beiden anderen Chromatogramme wurden vom Startfleck bis zur Lösungsmittelfront in gleichmässige Streifen geschnitten und mittels Wasserdurchlauf eluiert. Um alle überhaupt vorkommenden hydrolysierbaren Cholinverbindungen sicher zu erfassen, mussten sie in das am Froschrectus mit grosser Empfindlichkeit nachweisbare Acetylcholin übergeführt werden. Deshalb erfolgte anschliessend die Hydrolyse der getrockneten Eluate durch Behandeln mit

normaler Salzsäure bei 1,2 atü über 2 Stunden. Der nach der Vakuumtrocknung verbleibende Rückstand wurde mit 2 ml Acetanhydrid und 8 ml Eisessig versetzt, eine Stunde am Rückflusskühler gekocht, erneut getrocknet, in Ringerlösung aufgenommen und dann am Froschrectus getestet. Nur die Proben, die aus $R_f$-Bereichen stammten, die auch durch Dragendorff's-Reagenz nachweisbare Cholinverbindungen enthielten, verursachten eine Kontraktion des Muskels.

Ein zweites Rattenhirn wurde genauso aufgearbeitet. Wieder diente ein Chromatografiestreifen zur Anfärbung mit Dragendorff's-Reagenz und die beiden anderen wurden in Streifen geschnitten und einzeln eluiert. Die Untersuchung der einzelnen Areale auf kontraktionsauslösende Stoffe am Froschrectus erfolgte diesmal zunächst ohne vorherige Hydrolyse und Acetylierung zur Erfassung des Acetylcholins und etwaiger anderer wirksamer Cholinverbindungen. Dann wurde acetyliert ohne vorherige Hydrolyse zur Erfassung von Cholin und schliesslich nach der Hydrolyse acetyliert zur Erfassung anderer Cholinverbindungen.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 wiedergegeben. Ausser in den angeführten drei Regionen zeigte sich nur noch eine weitere kontrahierend wirkende Substanz. Diese enthielt das zur Aufarbeitung zugesetzte Prostigmin. Nach MIQUEL (54) hat Prostigmin in hohen Dosen

| Fraktion | direkt | acetyliert | hydrolysiert | acetyliert nach Hydrol. |
|---|---|---|---|---|
| Acetylcholin nach $R_f$ und Anfärbung | + | + | - | + |
| Cholin nach $R_f$ und Anfärbung | - | ++ | - | ++ |
| GABuCh nach $R_f$ und Anfärbung | - | + | - | +++ |

Tabelle 4. Verhalten der Hirnfraktionen am Froschmuskel vor und nach chemischer Behandlung (s. Text)

eine kontrahierende Wirkung am Muskel. Die einzige im Rattenhirn in messbarer Konzentration vorliegende Substanz, die beim direkten Test eine Wirkung an der Muskelpräparation zeigte, ist demnach Acetylcholin. Propionylcholin und Butyrylcholin, die ebenfalls im Rattenhirn vorkommen sollen (36), hätten höhere $R_f$-Werte und, auf das Molgewicht bezogen, auch eine andere Wirkungsstärke zeigen müssen. Das war hingegen nicht nachweisbar. Für Cholin ist die Färbung beim Nachweis mit Dragendorff's-Reagenz charakteristisch. Bisher ist ausser Cholin keine Verbindung bekannt, die mit dem genannten Reagenz eine blau-violette Färbung gibt. Auch die quantitative Analyse zeigte nach dem Acetylieren mit und ohne vorherige Hydrolyse gleiche Werte, sodass eine Vermischung mit anderen cholinhaltigen Verbindungen ausgeschlossen werden kann. Das Eluat des dritten cholinhaltigen Areals, in dem auf Grund des $R_f$-

Wertes GABuCh erwartet wurde, verhielt sich unerwartet. GABuCh lässt sich erst nach Hydrolyse als ACh am Rectus bestimmen (s. S. 27). Freies Cholin war in dieser Fraktion nicht anwesend , dennoch reagierte der Muskel bereits nach dem Acetylieren ohne vorherige Hydrolyse. Chromatografisch liess sich durch Dragendorff-Anfärbung in dem acetylierten Eluat Acetylcholin identifizieren. Hier muss also aus der Cholinverbindung X wahrscheinlich durch Umesterung Acetylcholin entstanden sein.

B) Nachweis und Hydrolyse von Glycerylphosphorylcholin und Phosphorylcholin

1) Isolierung und Identifizierung

Eine der Cholin enthaltenden Substanzen,die sich bei der GABuCh-Bestimmung störend bemerkbar gemacht hatten, gab auf dem Chromatogramm mit Phosphatreagenz (s. S. 20) eine positive Reaktion. Die fragliche Substanz besteht also zumindest aus Cholin und Phosphat. Zur Isolierung dieses Stoffes wurden 100 Rattenhirne in der gleichen Weise extrahiert, wie im vorigen Abschnitt beschrieben. Wegen der hohen Konzentration gelöster Stoffe musste der Extrakt aus einem Gehirn auf 6 Flecke verteilt werden, die gerade auf einen Bogen von 20 cm Breite unterzubringen waren. Als Lösungsmittel für die abstei-

gende Chromatografie diente n-Butanol: n-Propanol : Äthanol : 80% Ameisensäure : Wasser im Verhältnis 6 : 2 : 1 : 1 : 2. Von jedem Bogen wurde ein Längsstreifen, der einem der aufgetragenen Flecke entsprach, angefärbt und dadurch das Areal ermittelt, das GABuCh und Cholinester X enthielt. Die Elution der korrespondierenden Abschnitte der 5 weiteren, auf dem gleichen Bogen entwickelten Chromatogramme erfolgte mit Wasser. An die Gefriertrocknung der vereinigten Eluate schloss sich zur weiteren Reinigung eine Rechromatografie im gleichen System an. Die Chromatogramme wurden in gleicher Weise behandelt, und die Eluate ebenfalls aus dem gefrorenen Zustand zur Trockne gebracht. Nur ein Teil des Rückstandes liess sich in Äthanol lösen, der Rest konnte mit Wasser aufgenommen werden. In beiden Fraktionen befand sich auf Grund chromatografischer Kriterien GABuCh und die unbekannte Cholinverbindung, die Phosphat enthielt.

Zur weiteren Reinigung wurde das wässrige Eluat tropfenweise mit absolutem Äthanol versetzt. Dabei entstand eine Trübung, die sich beim Zentrifugieren als gelbbräunliche, ölige Flüssigkeit absetzt. Darin war der grösste Teil der gesuchten Cholinverbindung enthalten. Nach Abtrennung anionischer Stoffe durch eine DOWEX I X 2 Anionenaustauschersäule in der Acetatform wurden noch zahlreiche Verunreinigungen festgestellt. Durch Hydrolyse bei 1,2 atü in 6 normaler Salzsäure

über 3 Stunden entstanden papierchromatografisch zu trennende Stoffe, die sich mit Ninhydrin anfärbten, von denen aber keine mit den auf Grund ähnlicher $R_f$-Werte ausgewählten Aminosäuren Serin, Alanin, Glycin, γ-Aminobuttersäure, Histidin, Methylhistidin, Methionin identisch war. Die Analyse von Cholin und Phosphat ergab ein Verhältnis von Phosphat : Cholin von 0,42. Die Hydrolyse in normaler Salzsäure bei 1,2 atü ergab die in Tabelle 5 dargestellten Resultate.

| Proben Nr. | Hydrolyse Dauer | nMol Cholin | nMol Phosphat | Verhältnis $\frac{\text{Phosphat}}{\text{Cholin}}$ |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 30 min. | 55 | 230 | 4,3 |
| 2 | 60 min. | 31 | 280 | 9,0 |
| 3 | 120 min. | 40 | 262 | 6,5 |
| 4 | 240 min. | 44,5 | 250 | 5,6 |
| 5 | 480 min. | 62 | 245 | 3,9 |

Tabelle 5. Hydrolyse der verunreinigten gesuchten Cholinverbindung in 1 n HCl. Cholin am Froschmuskel (S. 25 ff), Phosphat nach BERENBLUM und CHAIN (S. 42 f) bestimmt.

Mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese bei pH 3,9 in Eisessig-Pyridin Puffer mit 16 - 20 mA und 3,0 kV über 6 Stunden wurde keine Abtrennung ins Gewicht fallender Begleitstoffe erreicht. Durch Zerstörung der anwesenden Aminosäuren mit Ninhydrin und anschliessender Papierchromatografie wie auch durch Behandlung mit Dinitrofluorobenzol und nachfolgender Papierchromatografie konnten nur wenige der anhaftenden Begleitstoffe beseitige werden. Die Fällung mit Reagenzien, die mit Cholin und basischen Cholinverbindungen unlösliche Produkte ergeben, führte ebenfalls nicht zum Ziel. Folgende Fällungsmittel wurden probiert:

Platinchlorid-Chlorwasserstoffsäure (33), Goldchlorid-Chlorwasserstoffsäure (33), Quecksilber (II)chlorid (33), Phosphorwolframsäure (33), Ammoniumreineckat (33), Dipikrylamin (33), Tetraphenylborat (52). Schliesslich gelang die Fällung mit Kadmiumchlorid (7), allerdings erst nach Zusatz von Äther. Zur Gewinnung einer grösseren zur Analyse ausreichenden Menge der fraglichen Substanz wurden 200 Rattenhirne wie vorher beschrieben extrahiert und der wässrige Extrakt über einen Dowex I X 2 Anionenaustauscher (Formiatform) und über einem Amberlite IRC 50 Kationenaustauscher (H-Form) gegeben. Der gesuchte Cholinester wird von keinem der beiden Ionenaustauscher zurückgehalten. Eine partielle Reinigung erfolgte durch Zugabe von

Methanol, wodurch ein Teil der Begleitstoffe ausfällt. Der Überstand wurde eingeengt und mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese aufgetrennt. Nach Elution der entsprechenden Fraktion konnte eine weitere Reinigung durch die Papierchromatografie erzielt werden. Der so gewonnene Extrakt löste sich in 0,5 ml absolutem Äthanol. Durch Zusatz von 100 mg $CdCl_2$ in 1,0 ml Äthanol und tropfenweise Zugabe von Äther fiel ein Niederschlag, der abzentrifugiert wurde. Aus dem Überstand konnte durch weiteren Zusatz von Äther eine zweite Fällung erhalten werden. Diese wurde ebenfalls abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nochmaliger Zusatz von Äther brachte eine dritte Fällung, die allerdings nach chromatografischer Untersuchung den gesuchten Ester nicht enthielt, während in den ersten beiden Fällungen der charakteristische Fleck auftrat. In beiden gefällten Fraktionen wurden Phosphat und Cholin bestimmt. Die Werte sind in Tabelle 6 angegeben. Aus den verschiedenen Verseifungsbedingungen der

| Fraktion | Phosphat | Cholin | | Cholin:Phosphat | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | $2^h$ 100° | $5^h$ 1,2 atü | $2^h$ | $5^h$ |
| I | 1,81 /uM | 0,21 /uM | 1,27 /uM | 1:8,55 | 1:1,43 |
| II | 1,61 /uM | 1,46 /uM | 1,44 /uM | 1:1,10 | 1:1,12 |

Tabelle 6. Hydrolyse-Eigenschaften der $CdCl_2$-Fällungen. Je 1 mg eingesetzt; Hydrolyse mit 1 n HCl

beiden Fraktionen ist zu ersehen, dass es sich um zwei verschiedene Phosphat- und Cholin-haltige Substanzen handelt. Beide Fällungen wurden in verschiedenen Lösungsmitteln mit Phosphorylcholin (PC) und Glyceryl-phosphorylcholin (GPC) verglichen (Abb. 13 und 14).

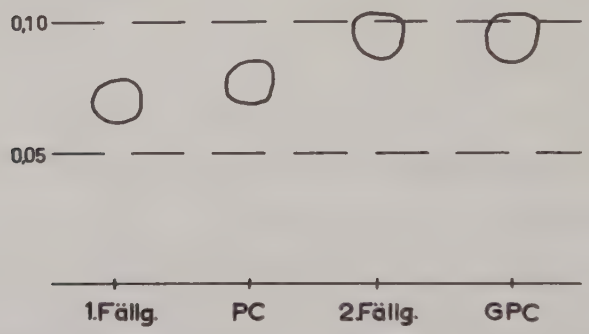



Abbildung 13.

Papierchromatografischer Vergleich isolierter Cholinester mit PC und GPC. Lösungsmittel 1; Dragendorffanfärbung

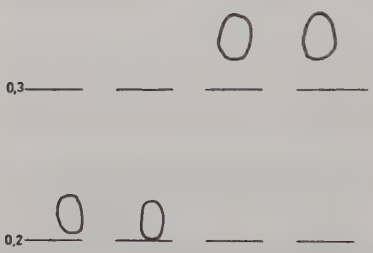
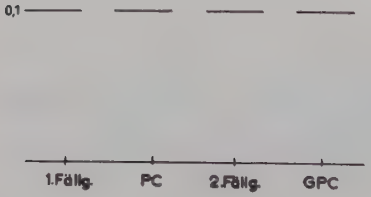



Abbildung 14.

Papierchromatogramm Lösungsmittel 2; Phosphatanfärbung



Mit Isopropanol : Wasser 4 : 1 ergaben sich folgende $R_p$-Werte:

PC 0,02 1. Fällung 0,02 GPC 0,22 2. Fällung 0,22.

Zur weiteren Identifizierung der 2. Fällung diente die Papierchromatografie in Patridge-Gemisch (n-Butanol : Eisessig : Wasser 4 : 1 : 5), dargestellt in Abbildung 15. Abbildung 16 zeigt das elektrophoretische Verhalten dieser Fraktion im Vergleich zu α-Glycerylphosphorylcholin.

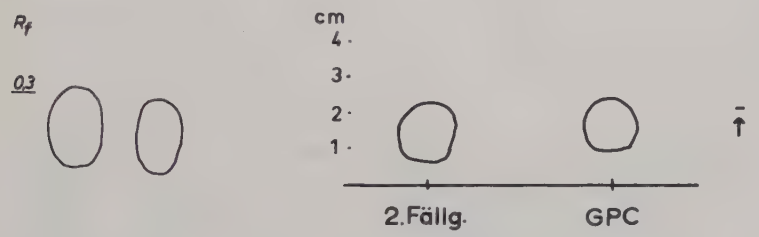



Abbildung 16.

Hochspannungselektrophorese von isoliertem (Fällg. 2) und authentischem Glycerylphosphorylcholin (GPC). Bedingungen wie S. 21 angegeben. Anfärbung mit Dragendorff's-Reagenz.

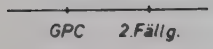



Abbildung 15.

Papierchromatografie in Patridge-Gemisch. Mit Dragendorff's-Reagenz angefärbt.

Infrarotspektren in Kaliumbromid wurden von Herrn Dr. Neudert [x], Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin, angefertigt. Zum Vergleich sind in den Abbildungen 17 und 18 die Spektren der Kadmiumchlorid-Doppelsalze des Glycerylphosphorylcholins und des Phosphorylcholins abgebildet. Die für alle Cholin-

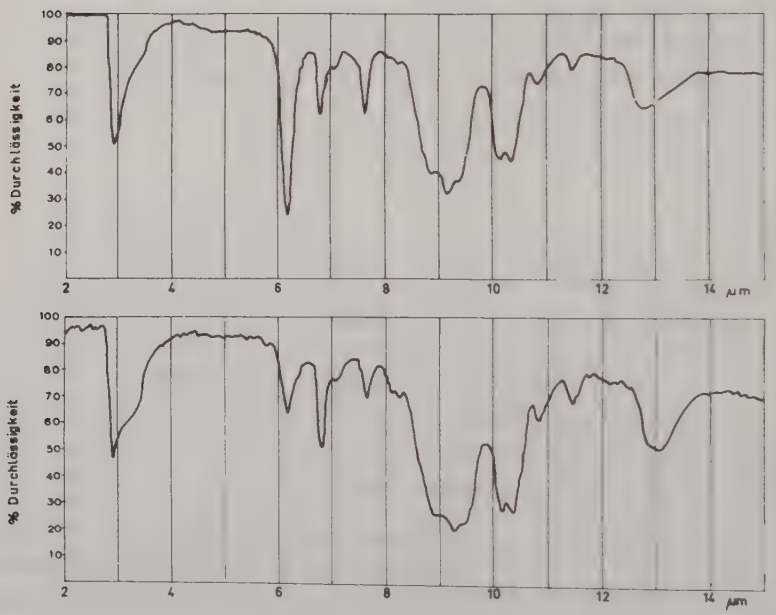



Abbildung 17. Infrarotabsorptionsspektren in KBr (0,5 mg in 100 mg)
Oben: Phosphorylcholin-Kadmiumchlorid-Doppelsalz
Unten: Fällung I

[x] Für die Durchführung der Analysen bin ich Herrn Dr. Neudert zu Dank verpflichtet.

ester und Cholin charakteristische Bande bei 3,35 µ (25) ist beim Phosphorylcholin nur als Schulter angedeutet, während Glycerylphosphorylcholin diese Bande deutlich zeigt. Dagegen ist das die N-Methyl-Bindung anzeigende Maximum bei 6,75 - 6,80 µ in beiden Verbindungen deutlich auszumachen. Die im Wellenlängenbereich von 9,5 - 11,0 µ liegenden Maxima könnten mit der P-O-C Konfiguration beider Verbindungen zusammenhängen. Jedenfalls stimmen die Infrarotspektren der authentischen Verbindungen mit denen der isolierten Stoffe überein.

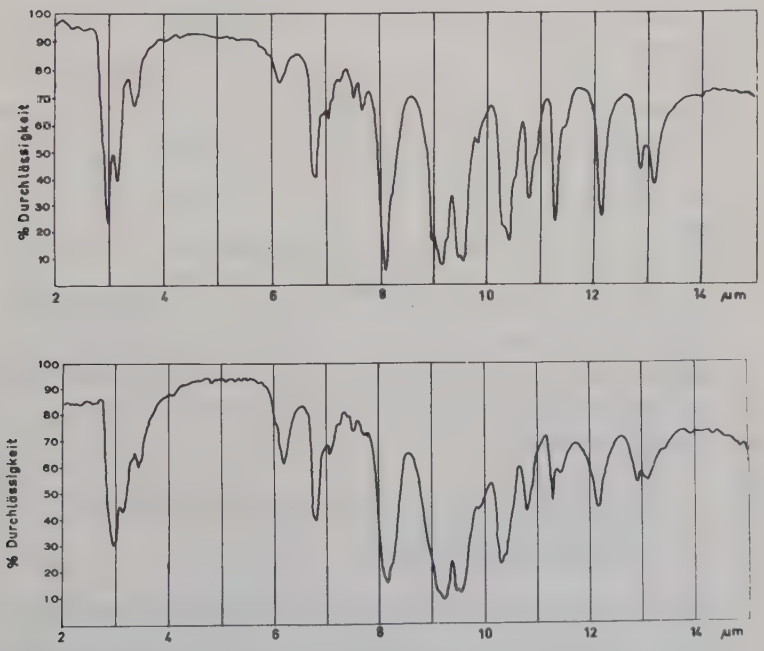



Abbildung 18. Infrarotabsorptionsspektren von authent. Glycerylphosphorylcholin (oben) und Fällung II (unten)

Bei der quantitativen Analyse von Cholin, Phosphat und Glycerin in dem isolierten GPC weichen die gefundenen Werte 1,2 - 1,35% von den errechneten Werten ab, was aus den Zahlen der Tabelle 7 hervorgeht. Somit ist nachgewiesen, dass eine der isolierten Cholinverbindungen mit Phosphorylcholin, die andere mit GPC identisch ist.

| - | Cholin | Phosphat | Glycerin |
|---|---|---|---|
| berechnet | 25,6 /ug | 6,55 /ug | 97,0 /ug |
| gefunden (Mittelwert von 2 Bestimmungen) | 25,9 /ug | 6,55 /ug | 95,7 /ug |
| % Abweichung vom theoretischen Wert | + 1,22 | ± 0,00 | - 1,35 |

Tabelle 7. Analyse der 2. Fällung nach mehrfachem Umkristallisieren. Cholin als Acetylcholin am Froschmuskel (s. S. 25), Phosphat nach der auf Seite 42 f und Glycerin nach der auf Seite 43 f angegebenen Methode bestimmt.

2) Hydrolyse von Glycerylphosphorylcholin und Phosphorylcholin

Um die chemischen Eigenschaften von GPC und PC kennen zu lernen, wurden zunächst die Verseifungsgeschwindigkeiten studiert.

a) Verseifung von Glycerylphosphorylcholin

Nach WEIL-MALHERBE (61) zerfällt GPC nach 20 min. Erhitzen in normaler Salzsäure vollständig in Cholin und Glycerinphosphorsäure. Bei der quantitativen Analyse des isolierten GPC gelang eine restlose Spaltung durch Erwärmung der Probe in normaler Salzsäure im siedenden Wasserbad in 30 min. (s. Tabelle 3).

Zur Prüfung der Stabilität im alkalischen Bereich wurden 100 /ug (GPC) ($CdCl_2$) x 3 $H_2O$ mit 2,0 ml 0,2 normalem Ammoniak 45 min. bei 35° C im Brutschrank inkubiert. Chromatografisch konnte kein Cholin gefunden werden. Nach dem Trocknen und Acetylieren trat jedoch bei der Papierchromatografie Acetylcholin auf. Die quantitative Auswertung durch biologische Bestimmung von Acetylcholin am Rectus abdominis des Frosches (4 Einzeluntersuchungen) zeigt die Tabelle 8.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ACh in n Mol | 35,7 | 28,6 | 24,8 | 38,2 |
| % des eingesetzten GPC (211 n Mol) | 17,1 | 14,1 | 12,3 | 18,9 |

Tabelle 8. Umesterung von GPC zu Acetylcholin durch Kochen mit Acetanhydrid

Auch bei der Acetylierung von reinem, nicht mit Ammoniak vorbehandeltem GPC, das stets als Kadmiumchlorid-Doppel-

salz eingesetzt wurde, entstanden etwa die gleichen Mengen Acetylcholin, nämlich 12,0 und 13,6% (2 Einzeluntersuchungen).

Mit Hilfe der chemischen Acetylcholinbestimmung mit Dipikrylamin wurde die Abhängigkeit der Acetylcholinbildung aus GPC von der Dauer der Behandlung mit Essigsäureanhydrid gemessen. Es zeigt sich eine gradlinige Abhängigkeit der Bildungsrate von der Zeit, wie aus der Abbildung 19 hervorgeht.

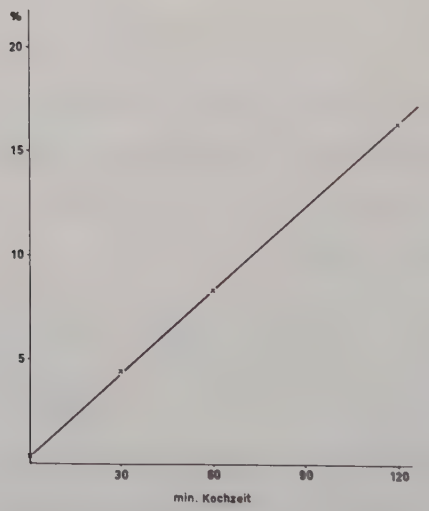



Abbildung 19. Acetylcholin aus GPC durch Erhitzen mit Acetanhydrid. Prozentualer Anteil des zu ACh umgesetzten GPC in Abhängigkeit von der Kochzeit.

Die Hydrolyse von GPC kann folglich nicht durch die Bestimmung des Cholin als Acetylcholin verfolgt werden, weil beim Erhitzen von GPC in Essigsäureanhydrid Acetylcholin entsteht. Infolgedessen sind die bisher ermittelten Werte für GABuCh nicht richtig.

b) Verseifung von Phosphorylcholin

Phosphorylcholin (PC) lässt sich nur schwer hydrolysieren. Dafür ist eine hohe Säurekonzentration, hohe Temperatur und lange Zeit erforderlich. Deshalb musste geprüft werden, ob das dabei frei werdende Cholinchlorid unter diesen Bedingungen stabil ist. Von einer Cholinlösung wurden je 50 µg in 5 Kolben pipettiert, mit steigenden Mengen Salzsäure versetzt und alle Ansätze 3 Stunden lang bei 1,2 atü im Autoklaven auf 130° C erhitzt. Nach dem Entfernen der Salzsäure und des Wassers im Luftstrom wurde Cholin als Acetylcholin in der angegebenen Weise biologisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 grafisch dargestellt.

In 1 normaler Salzsäure war das Cholin stabil, wurde aber bei höheren Säurekonzentrationen partiell zerstört. Im nächsten Versuch zeigte sich, dass Cholin in 1 normaler Salzsäure bis zu 4 Stunden bei 1,2 atü nicht verändert wird (Abbildung 21).

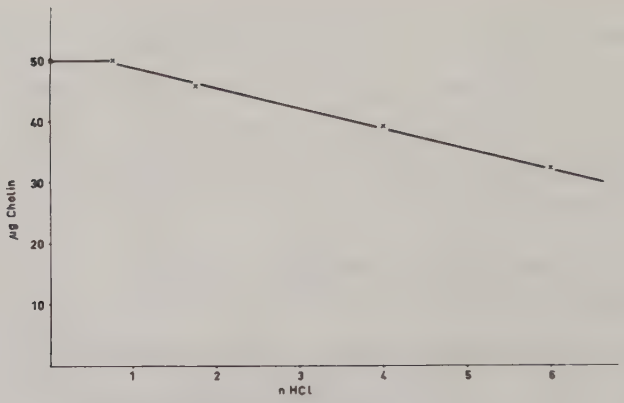



Abbildung 20. Zerstörung von Cholin bei Erhitzen unter Druck (1,2 atü) in steigender Salzsäurekonzentration

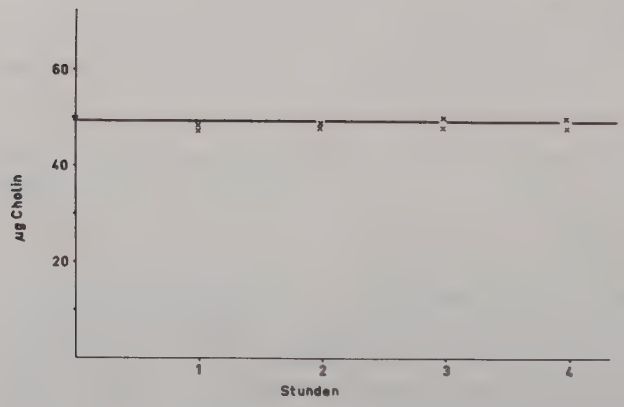



Abbildung 21. Verhalten von Cholin in normaler Salzsäure unter 1,2 atü Druck in Abhängigkeit von der Dauer

3) Quantitative Bestimmung von Glycerylphosphorylcholin

Der quantitative Nachweis von GPC und PC kann Aufschluss über die Rolle dieser beiden Cholinester im Stoffwechsel des Gehirns geben. Für Phosphorylcholin ist die Konzentration im Rattenhirn von ANSELL und SPANNER (1) geprüft worden. Sie extrahierten mit Trichloressigsäure, reinigten den Extrakt durch Ausschütteln mit Äther und Aktivkohle und trennten PC papierchromatografisch ab. Die Bestimmung als Phosphat ergab 0,2 /uMol/g Frischgewicht.

Eine direkte Bestimmung von Glycerylphosphorylcholin in Hirngewebe ist bisher nicht vorgenommen worden. In Rinderhirn konnten SCHMIDT, HECHT, FALLOT, GREENBAUM und THANNHAUSER als Cholin in der Reineckat Methode nur unbestimmbar kleine Mengen GPC nachweisen (67), den Gehalt an Glycerinphosphatestern bestimmten SCHMIDT, GREENBAUM, FALLOT, WALKER und THANNHAUSER mit 207 nMol/g (68). Darin müsste aber neben GPC auch Glycerylphosphoryläthanolamin enthalten sein.

Zur quantitativen Isolierung von GPC konnte das Extraktionsverfahren vereinfacht werden, weil dieser Ester in relativ grosser Menge vorliegt und gegen enzymatische und nichtenzymatische Verseifung wesentlich unempfindlicher ist als Acetylcholin oder GABuCh.

Die nach Einfrieren in Heptan von -40° C ausgewogenen Hirne wurden mit dem doppelten Volumen 10% Trichloressigsäure homogenisiert und 15 min. bei 16 000 U/min und 4° C zentrifugiert. Aus dem klaren Überstand erfolgte die Entfernung der Trichloressigsäure und der säurelöslichen Lipoide durch dreimaliges Ausschütteln mit der siebenfachen Menge Diäthyläther und durch Schütteln mit 1 g Kationenaustauscher Permutit RS in der $H^+$-Form die Entfernung von Cholin und basischen Cholinestern.

Die Bestimmung des GPC erfolgte über Cholin nach Hydrolyse bei 100° C über 40 min. in normaler Salzsäure. Das ebenfalls in der Lösung befindliche Phosphorylcholin wird unter diesen Bedingungen nicht angegriffen. In der folgenden Tabelle sind mit der Dipikrylaminmethode und der biologischen Bestimmung als Acetylcholin am Froschrectus gefundenen Werte zusammengestellt.

Messungen mit beiden Methoden zeigen trotz Abweichungen bei den Einzelwerten im Mittel gute Übereinstimmung. Das ist auch ein Hinweis darauf, dass alle mit der Dipikrylaminmethode erfassbaren Verbindungen, wie die Polyamine Spermin und Spermidin, mit dem Kationenaustauscher aus der Lösung entfernt wurden. Durch Äthernarkose treten keine Veränderungen der GPC-Konzentration im Gehirn auf.

| | | Äthernarkose | |
|---|---|---|---|
| kolorimetrisch | biologisch | kolorimetrisch | biologisch |
| 526 | 506 | 507 | 489 |
| 524 | 521 | 511 | 530 |
| 546 | 580 | 556 | 533 |
| 625 | 625 | 566 | 522 |
| 501 | 522 | 571 | 589 |
| 695 | 618 | 570 | 630 |
| 563 | 674 | 591 | 571 |
| 461 | 506 | 631 | 595 |
| 555 ± 73 | 556 ± 49 | 563 ± 40 | 557 ± 47 |

Tabelle 9. GPC-Gehalt des Rattenhirnes in nMol/g Frischgewicht. Gegenüberstellung von kolorimetrisch mit der Dipikrylamin-Methode und biologisch am Froschmuskel bestimmten Werten für in Äthernarkose und ohne Vorbehandlung getötete Tiere von 180 bis 200 g Gewicht.

C) Chromatografie der im Rattenhirn natürlich vorkommenden Cholinester

Das für die Trennung von Cholin, Acetylcholin, γ-Aminobutyrylcholin, Phosphorylcholin und Glycerylphosphorylcholin günstigste Lösungsmittelgemisch wurde experimentell ermittelt. Die dazu auf das Papier am Startfleck aufgebrachten Mengen betrugen: 20 µg Cholin-

chlorid, 20 µg Acetylcholinchlorid, 40 µg γ-Aminobutyrylcholinchlorid-Hydrochlorid, 80 µg Glycerylphosphorylcholin-Kadmiumchlorid Doppelsalz mit 3 Molekülen Wasser im Kristallgitter, 60 µg Phosphorylcholinchlorid-Kalziumslaz. Die Anfärbung erfolgte mit Dragendorff's-Reagenz und anschliessendem Besprühen mit Phosphatreagenz. Eine Reihe typischer Chromatogramme sind in Abbildung 22 schematisch zusammengefasst.

In säurehaltigen Lösungsmitteln gelingt die Trennung von PC, GPC und GABuCh nicht oder nur sehr unbefriedigend. Bei der Verwendung von Essigsäure bildet GABuCh ausserdem zwei Fraktionen (40). In ammoniakhaltigen Lösungsmitteln wird sowohl ACh, als auch GABuCh hydrolysiert. Wird der Ammoniakgehalt so weit gesenkt, dass keine Hydrolyse mehr auftritt, dann unterscheiden sich die Trennungseigenschaften nicht von wasserhaltigen Lösungsmitteln. Bei diesen Lösungsmitteln trennt sich GABuCh entweder schlecht von Cholin (iso-Propanol) oder schlecht von GPC (n-Propanol). Die Mischung von n-Propanol und iso-Propanol gibt deshalb keine brauchbare Trennung, weil alle Substanzen sehr starke Schwänze bilden. Die Verwendung von Ammonacetat ergab schliesslich eine befriedigende Trennung. Die Pufferung des Papieres mit Ammoniumacetat oder Natriumacetat erwies sich nicht als zweckmässig. Zum Teil werden diese Puffer vom Lösungsmittel gelöst und geben Streifen auf dem Papier. Ausserdem sind die gepufferten Papiere

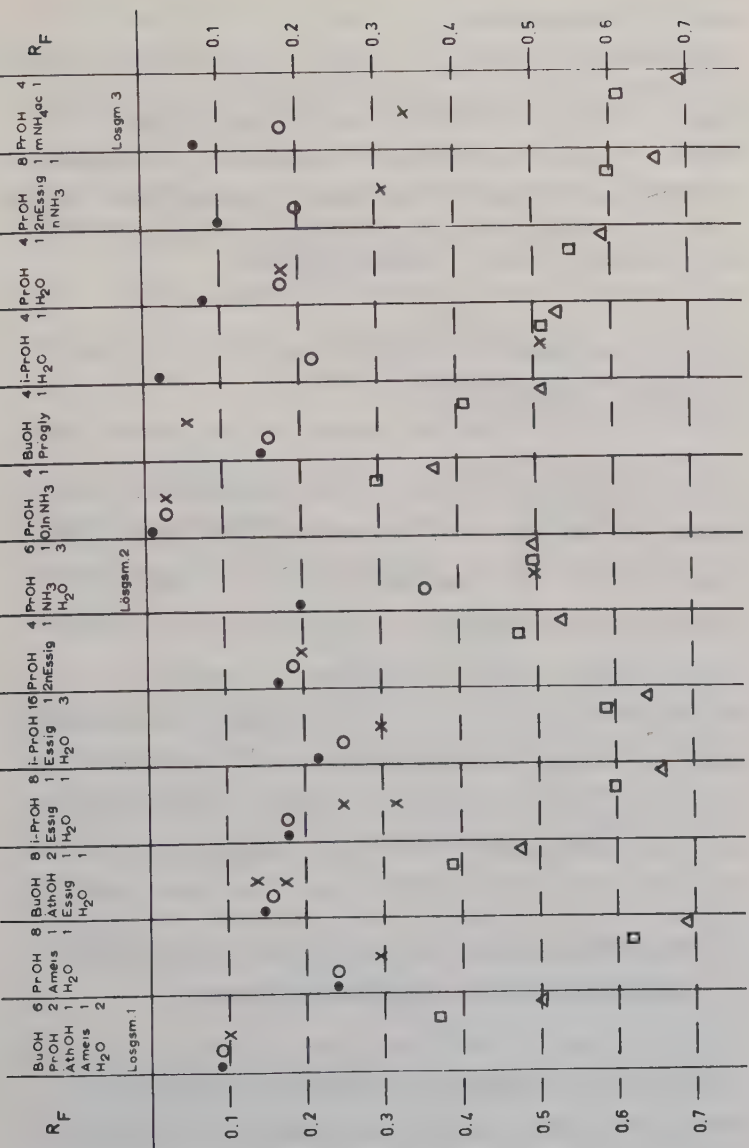



Abbildung 22. Legende siehe Seite - 74 -

Legende zu Abbildung 22.
Chromatografie von PC (.), GPC (o), GABuCh (x), Cholin (□), Acetylcholin (△). Abkürzungen: BuOH = n-Butanol, PrOH = n-Propanol, i-PrOH = Isopropanol, ÄthOH = Äthanol, Ameis = Ameisensäure 80%, Essig = Eisessig, 2n Essig = 2 normale Essigsäure, $NH_3$ = Ammoniak 25%, n $NH_3$ = normaler Ammoniak, m $NH_4ac$ = molare Ammoniumacetatlösung, Progly = Propylenglykol

schlecht anfärbbar. Vor allem waren die erhaltenen Trennungen schlechter.

In dem Lösungsmittelgemisch, das schliesslich verwendet wurde, war der Ammoniumacetatgehalt noch um 1/5 geringer (0,8 molar). Das Papier wurde mit diesem Lösungsmittel vorgewaschen. Die $R_f$-Werte der angegebenen Substanzen bleiben unverändert, jedoch konnten Unregelmässigkeiten in der Anfärbbarkeit und gelegentlich vorkommende Streifenbildung damit verhindert werden. Eine weitere Senkung der Ammonacetatkonzentration verschlechterte die Trennung wesentlich.

D) Bestimmung von Cholin, Acetylcholin und γ-Aminobutyrylcholin durch Isotopenverdünnung

Auf Grund der gewonnenen Resultate schien es angebracht, zur quantitativen Bestimmung die Isotopenverdünnungsmethode zu benutzen. Erste Versuche dienten

einer erneuten Überprüfung des Extraktionsverfahrens. Der angesäuerten wässrigen Lösung, die Prostigmin und Harnstoff enthält, wurde $^{3}$H-markiertes Cholin (s.S. 17) zugesetzt. In Heptan/Isoamylalkohol und in Äther befindet sich nach dem Schütteln und Zentrifugieren keine Aktivität. Während des Zentrifugierens setzt sich zwischen wässriger und organischer Phase der Gewebskuchen ab. Darin befanden sich etwa 5% der Radioaktivität. Durch nochmaliges Ausschütteln mit 1,0 ml Wasser wurde die im Gewebsrückstand verbliebene Aktivität auf 0,5% gesenkt. Der durch die Filtration bedingte Verlust betrug ca. 5%, durch sorfältiges Nachwaschen des Filters kann er auf ca.1% gesenkt werden.

Nach papierchromatografischer Trennung wurde die spezifische Aktivität durch Messen der Impulsrate im Flüssigkeitsszintillator und der Bestimmung von Cholin als Acetylcholin am Froschmuskel ermittelt. Die im Hirn vorhandene Menge berechnet sich dann nach der Formel

$$x = \left(\frac{S_1}{S_2} - 1\right) a$$

wobei $S_1$ die spezifische Aktivität der zugesetzten, $S_2$ die gefundene spezifische Aktivität der isolierten Substanz und a die Menge der zugesetzten Substanz ist. (Nach GÖTTE (33)).

Für die Konzentration von Cholin im Hirn von Ratten, deren Gewicht zwischen 140 und 200 g lagen, ergaben sich folgende Werte:

| nichtnarkotisierte Ratten | Ratten in Äthernarkose |
|---|---|
| 112 | 109 |
| 103 | 111 |
| 109 | 113 |
| 100 | 109 |
| 111 | 93 |
| 112 | 93 |
| | 101 |
| 107 ± 5,2 nMol | 96 |
| = 15,0 ± 0,7 µg | 105 |
| | 96 |
| | 100 |
| | 113 |
| | 102 |
| | 111 |
| | 103,7 ± 7,4 nMol |
| | = 14,5 ± 1,0 µg |

Tabelle 10. Cholinkonzentration im Rattenhirn. nMol pro g Frischgewicht

Bei Berechnung mit dem t-Test erweist sich die Differenz der Mittelwerte zwischen narkotisierten und nicht-narkotisierten Tieren nicht als signifikant ($t = 1,08$; $P = 1,25$; Berechnung nach WEBER (80)). Der Anstieg der Acetylcholinkonzentration während der

Narkose, der nach eigenen Untersuchungen 15 nMol/g und nach Angaben von HERKEN und NEUBERT (31) 10 nMol/g beträgt, wird also nicht von einer entsprechenden Verminderung der Cholinmenge begleitet.

Acetylcholin und GABuCh, von denen das Gehirn viel weniger enthält, liessen sich mit dieser Technik nicht so gut bestimmen wie Cholin, denn für eine Trennung auf dem Papier kann nur der Sechzehnte Teil des Extraktes aus einem Gehirn aufgetragen werden. Da es bei der Isotopenverdünnungsmethode nicht auf die vollständige Gewinnung, sondern auf die grösstmögliche Reinheit der Ester ankommt, konnten auch Trennverfahren eingeschaltet werden, die gewisse Verluste verursachen. Eine gute Reinigung des Extraktes wurde durch die Passage einer Säule aus Sephadex-Gel erreicht. Da das der Extraktionslösung zugesetzt Prostigmin, das eine starke Absorption von ultravioletter Strahlung aufweist, mit der gleichen Fraktion von der Säule kommt wie die zu bestimmenden Cholinverbindungen, konnte der entsprechende Anteil des Eluates durch spektrophotometrische Messung leicht abgegrenzt werden (s. S. 23). Nach dem Gefriertrocknen liess sich nun der Extrakt eines ganzen Rattenhirnes auf einen Fleck zur papierchromatografischen Trennung auftragen. Cholin und ACh werden gut voneinander getrennt, da Harnstoff, der in erheblichen Mengen der Extraktionslösung zugefügt ist, in dieser Säulenfraktion nicht eluiert wird.

Harnstoff hat einen $R_f$-Wert, der zwischen Cholin und Acetylcholin liegt, und die Trennung dieser Substanzen ungünstig beeinflusst.

Die mit dem angegebenen Verfahren gefundenen Werte für ACh und GABuCh sind in Tabelle 11 angegeben.

| Acetylcholinchlorid nMol/g Frischgewicht | γ-Aminobutyrylcholinchlorid-hydrochlorid nMol/g Frischgewicht |
|---|---|
| 11,7 | 1,32 |
| 10,7 | 1,56 |
| 10,7 | 1,35 |
| 10,8 | 1,29 |
| ——— | 1,53 |
| 11,0 ± 0,5 | ——— |
| = 2,0 ± 0,09 /ug | 1,41 ± 0,12 |
| | = 0,37 ± 0,03 /ug |

Tabelle 11. Konzentration an Acetylcholin und GABuCh im Gehirn von 180 - 200 g schweren Ratten.

Die GABuCh-Konzentration beträgt also rund 13% des Acetylcholingehaltes. Über die Konzentrationen am Orte der Wirkung lassen sich daraus keine Rückschlüsse ableiten, da nicht bekannt ist, welche Verbreitung die Synapsen im Zentralnervensystem haben, in denen die beiden Ester physiologisch eine Funktion ausüben.

E) Biochemischer Abbau von γ-Aminobutyrylcholin

1) Verseifung von γ-Aminobutyrylcholin

Zur Untersuchung der Stabilität des Cholinesters der γ-Aminobuttersäure wurden einstündige Hydrolyseversuche bei 37° C und verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Für pH 2 - 4 wurde normale Salzsäure in steigender Verdünnung, für pH 10 und 11 Ammoniaklösung, für die übrigen pH-Werte 1/15 molarer Sörensenphosphatpuffer benutzt. Die prozentuale Hydrolyse von GABuCh in Abhängigkeit vom pH-Wert ist in Abbildung 23 dargestellt. Mit Eintritt in den alkalischen Bereich fällt die Stabilität des Esters steil ab, wogegen er bei hoher $H^+$-Ionenkonzentration bis herab zu pH 1 bei 37° C ziemlich beständig ist.

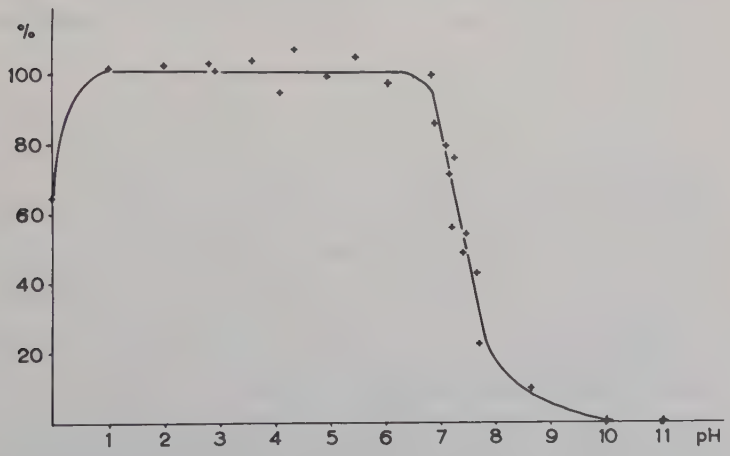



Abbildung 23. Stabilität von GABuCh bei 37° C in Abhängigkeit vom pH-Wert

2) Hydrolyse durch Cholinesterasen

Der Abbau von Estern wird häufig durch eine hydrolytische Spaltung eingeleitet. Deshalb lag es nahe anzunehmen, dass GABuCh von Cholinesterasen gespalten wird. Geprüft wurde die Serumcholinesterase, dessen natürliches Substrat bisher noch nicht bekannt ist, und die Acetylcholinesterase, die im Zentralnervensystem vorkommt, als deren physiologisches Substrat Acetylcholin gilt.

Die Untersuchungen wurden bei pH 6,9 , d. h. etwas unterhalb des Aktivitätsoptimus der Cholinesterasen vorgenommen, um die spontane Hydrolyse von GABuCh, das im alkalischen schnell verseift, gering zu halten. Bei der gewählten Wasserstoffionenkonzentration ist GABuCh, wie Abbildung 24 zeigt, über mehrere Stunden

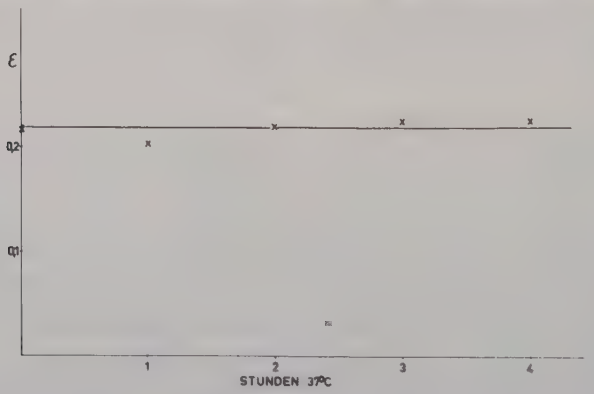



Abbildung 24. GABuCh in Phosphatpuffer pH 6,9 bei 37° C. Modifizierte Hestrinbestimmung

halbar. Als Puffergemisch diente primäres und sekundäres Phosphat nach der Angabe von Sörensen.

Zur Prüfung von Serumesterasen wurden verschiedene Verdünnungen von Serum mit diesem Puffergemisch bereitet. Von 1,0 ml Verdünnung dienten 0,1 ml zur Herstellung des Serumleerwertes. Nach Zusatz des Substrates als Trockensubstanz - 2,0 mg Acetylcholin oder 2,25 mg GABuCh, was einer Konzentration von $10^{-2}$ molar entspricht - erfolgte die Inkubation bei 37° C. Zur Kontrolle der Reaktionsgeschwindigkeit wurden zu verschiedenen Zeiten jeweils 0,1 ml abgenommen, in 1,9 ml heisses Wasser pipettiert und zur Denaturierung der Fermenteiweisse 3 min. im siedenden Wasserbad gehalten. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde die Esterkonzentration mit den Methoden nach Hestrin (s. S. 35 ff) bestimmt.

a) Rattenserum

Serumcholinesterase von Ratten hydrolysiert Acetylcholin mit einer Geschwindigkeit von 90 µMol pro ml und Stunde. Das Ferment ist durch Eserin $10^{-5}$ molar vollständig hemmbar (Abb. 25). Bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-6}$ molarem Eserin beträgt die Hemmung 60%, während Diisopropyl-fluorophosphat (DFP) in dieser Konzentration eine vollständige Hemmung bewirkt (Abb. 26). Zur Messung der wesentlich geringeren Aktivität gegen-

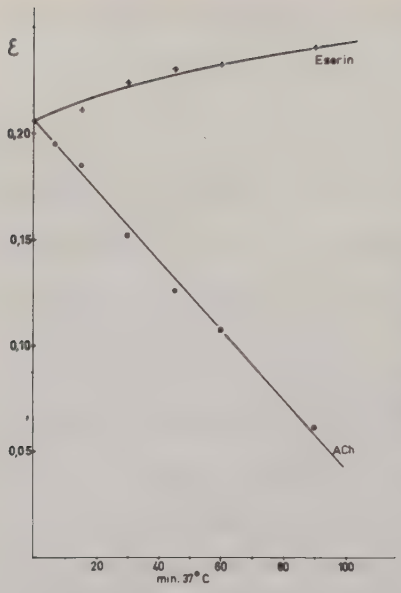



Abbildung 25.

Hydrolyse von Acetylcholin in 1:20 verdünntem Rattenserum
Hestrinmethode
o——o ACh $10^{-2}$
+——+ ACh $10^{-2}$ + Eserin $10^{-5}$

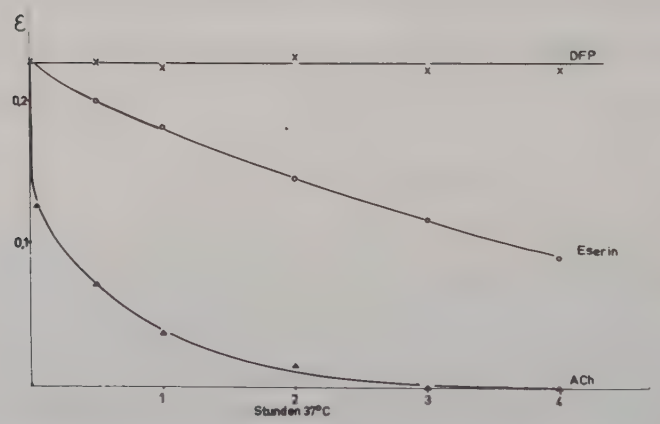



Abbildung 26. Hydrolyse von Acetylcholin in Rattenserum 1 : 10 verdünnt. Hestrinbestimmung.
Δ——Δ ohne Zusatz o——o Eserin 5 x $10^{-6}$
x——x DFP 5 x $10^{-6}$

über GABuCh wurde das Serum nur 1 : 2 verdünnt. Die Spaltung von GABuCh erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 4,2 /uMol/ml x h; 5 x $10^{-6}$ molar Eserin hat keine Hemmwirkung. Ebenso ist DFP bis zur Konzentration von $10^{-5}$ molar wirkungslos. (Abbildung 27).

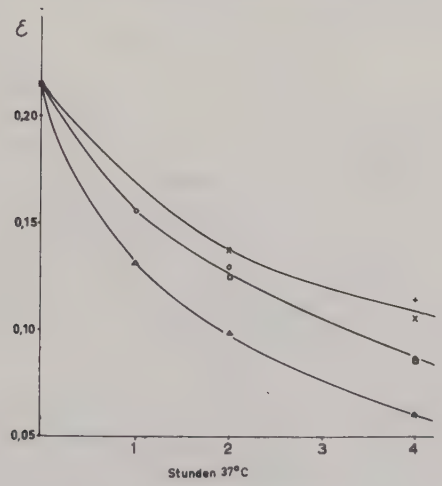



Abbildung 27. Hydrolyse von GABuCh in Rattenserum 1 : 2 verdünnt. Modifizierte Hestrinbestimmung

o——o GABuCh $10^{-2}$
x——x GABuCh $10^{-2}$ + DFP $5x10^{-6}$
□——□ GABuCh $10^{-2}$ + DFP $10^{-6}$
+——+ GABuCh $10^{-2}$ + DFP $5x10^{-5}$
△——△ GABuCh $10^{-2}$ + Eserin $5x10^{-6}$

b) Katzenserum

enthält weniger Cholinesterase als Rattenserum. Die Acetylcholinspaltung erfolgte bei der Verdünnung des Serums 1 : 20 mit einer Geschwindigkeit von 29 /uMol/ml

x h. Zur Hydrolyse von GABuCh wurde das Serum wiederum zehnfach konzentrierter verwendet. Die Aktivität betrug 0,85 /uMol/ml Serum x Stunde. Die Hemmung der Enzymaktivität war ebenfalls gering. $10^{-5}$ molar Eserin verringerte die Hydrolyse um 20%, $10^{-5}$ molar DFP um ca. 35% (Abbildung 28).

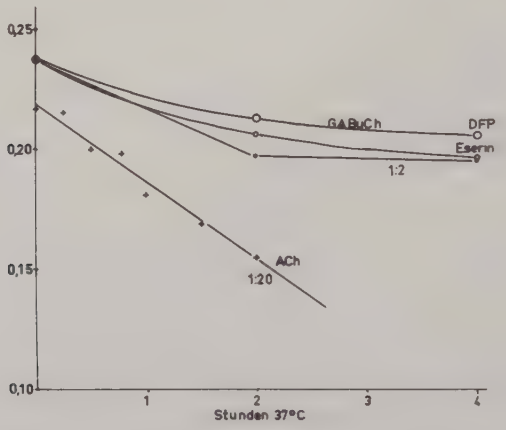



Abbildung 28. Katzenserumcholinesterase

+——+ ACh $10^{-2}$ Serum 1 : 20 .——. GABuCh $10^{-2}$ Serum 1 : 2

o——o GABuCh $10^{-2}$ Eserin $10^{-5}$ 0——0 GABuCh $10^{-2}$ DFP $10^{-5}$

c) Taubenserum

enthält mehr Cholinesteraseaktivität als Ratten- und Katzenserum. Von Acetylcholin werden 116,5 /uMol/ml x h, von GABuCh 17,7 /uMol/ml x h gespalten. Die Hydro-

lyse beider Substrate wird durch $10^{-5}$ Mol/L Eserin oder DFP vollständig unterdrückt (Abbildung 29).

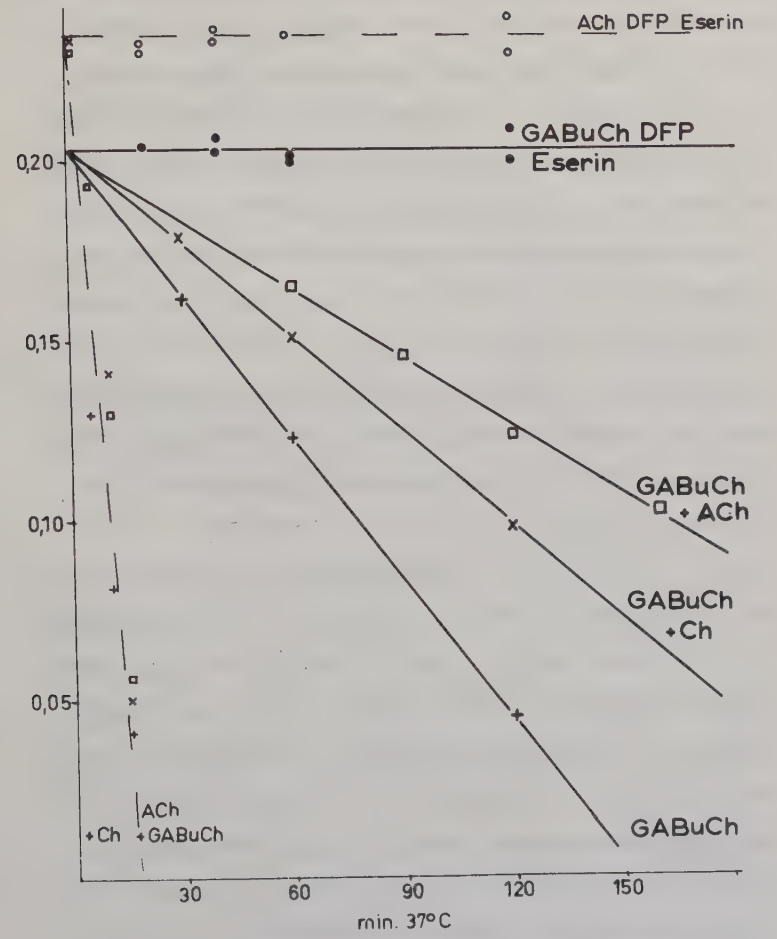



Abbildung 29. Taubenserumesterase Verdünnung 1 : 5

+——+ GABuCh $10^{-2}$
x——x GABuCh $10^{-2}$, Cholin $10^{-2}$
□——□ GABuCh $10^{-2}$, ACh $10^{-2}$
●——● GABuCh $10^{-2}$, DFP bzw. Eserin $10^{-5}$

+---+ ACh $10^{-2}$
x---x ACh $10^{-2}$, Cholin $10^{-2}$
□---□ ACh $10^{-2}$, GABuCh $10^{-2}$
o---o ACh $10^{-2}$, DFP bzw. Eserin $10^{-5}$

Dieses gleichartige Verhalten liess zunächst vermuten, dass die Verseifung beider Substrate durch das gleiche Enzym erfolgt. Deshalb wurde geprüft, ob eine Substratkonkurrenz stattfindet. Werden zu diesem Zweck beide Cholinester in gleicher Konzentration vorgelegt, so verläuft die Spaltung von Acetylcholin völlig unbehindert, was aus Abbildung 29 zu ersehen ist. Dagegen ist die Esterasewirkung gegenüber GABuCh um 50% verlangsamt. Der Hemmeffekt kann jedoch nicht auf Acetylcholin zurückgeführt werden, weil ACh sehr schnell gespalten wird, sodass der Effekt schon nach kurzer Zeit deutlich geringer werden müsste. Dann dürfte die Hydrolysenkurve nicht linear verlaufen, sondern eine Krümmung in Richtung der x-Achse aufweisen. Das ist jedoch nicht der Fall. Folglich war zu schliessen, dass die Hemmung der GABuCh-Spaltung durch bei der ACh-Hydrolyse entstehende Stoffe bedingt ist. Die Experimente bestätigten diese Vermutung. Durch $10^{-2}$ Mol/L Cholin tritt eine 35%ige Hemmung der GABuCh-Spaltung ein. Das zweite Spaltprodukt des Acetylcholins, die Essigsäure, vermindert ebenfalls die Hydrolyse von GABucH. Andererseits tritt jedoch durch die bei der GABuCh-Spaltung auftretende γ-Aminobuttersäure weder eine Hemmung des Acetylcholinabbaus, noch der Verseifung von GABuCh auf. Da die Spaltung von GABuCh auch Salzsäure freisetzt, weil die Dissoziation der Aminogruppe in der γ-Aminobuttersäure schwächer ist als in GABuCh, wurde auch der Einfluss von

Salzsäure geprüft. Bei der Konzentration von $10^{-2}$ Mol/L wird die Acetylcholinspaltung nicht gehemmt, die von GABuCh jedoch genauso stark eingeschränkt wie durch Essigsäure. Aus den Befunden lässt sich ableiten, dass die GABuCh-Spaltung im Serum, die langsamer erfolgt als die von ACh, nicht durch das gleiche Enzym katalysiert wird wie die Acetylcholinhydrolyse. Die Verschiedenartigkeit der beiden beteiligten Enzyme geht aus mehreren Befunden hervor. Das Verhältnis von ACh-spaltender Aktivität zu GABuCh-spaltender ist bei den untersuchten drei Tierarten verschieden. Die Berechnungen sind in der letzten Spalte der Tabelle 12 aufgeführt. Der Anteil der GABuCh-Spaltung beträgt 3%

| | ACh | GABuCh | $\frac{\text{GABuCh}}{\text{ACh}} \times 100$ |
|---|---|---|---|
| Rattenserum | 90 | 4,2 | 4,7 |
| Katzenserum | 29 | 0,85 | 2,93 |
| Taubenserum | 116,5 | 17,7 | 15,2 |

Tabelle 12. Vergleich der Esteraseaktivität verschiedener Sera gegenüber ACh und GABuCh

bei der Katze, 5% bei der Ratte und 15% bei der Taube. Die Cholinesterase des Rattenserums kann durch Eserin und DFP vollständig gehemmt werden. Die gleichen Konzentrationen dieser beiden Gifte beeinträchti-

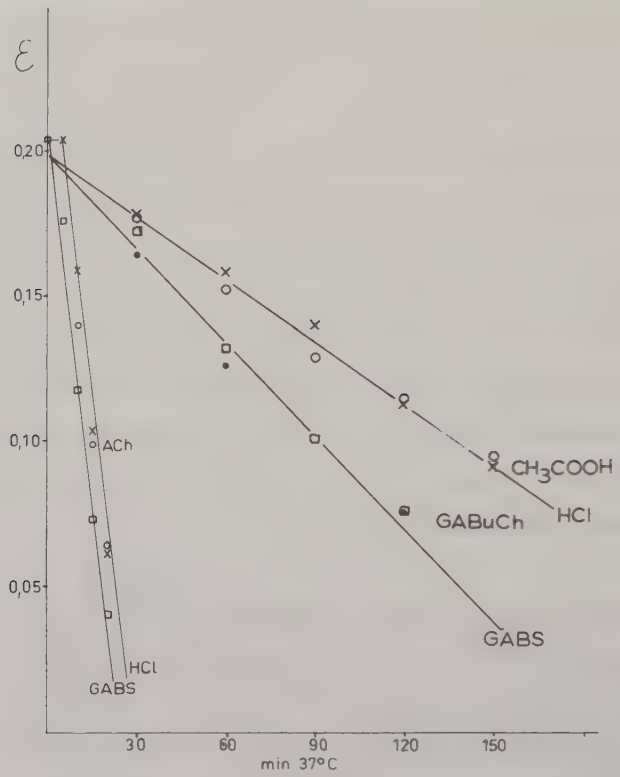



Abbildung 30. Taubenserumesterase

□---□ ACh $10^{-2}$ + GABS $10^{-2}$
o---o ACh $10^{-2}$ + $CH_3COOH$ $10^{-2}$
x---x ACh $10^{-2}$ + HCl $10^{-2}$

.—. GABuCh $10^{-2}$
□—□ GABuCh $10^{-2}$+GABS $10^{-2}$
o—o GABuCh $10^{-2}$+$CH_3COOH$ $10^{-2}$
x—x GABuCh $10^{-2}$+HCl $10^{-2}$

gen die GABuCh-Spaltung im Rattenserum jedoch nicht. Dagegen sind Eserin und DFP im Taubenserum starke Hemmstoffe für die Spaltung beider Cholinester. Hier wie-

derum zeigen sich Unterschiede in der Empfindlichkeit gegen Cholin, das nur die Hydrolyse von GABuCh verlangsamt, dan Abbau von ACh aber nicht beeinflusst.

d) Taubenhirnhomogenat,

das 200 mg Taubenhirn in 1 ml Phosphatpuffer pH 6,9 enthält, hat eine so hohe Acetylcholinesterase-Aktivität, dass $10^{-2}$ molares Acetylcholin schon nach 80 sec. abgebaut ist. GABuCh wird nicht angegriffen. Im Verlauf von 4 Stunden ist keine Abnahme der Konzentration zu messen.

e) Rattenhirnschnitte

wurden in Rattenserum mit $10^{-2}$ molarem GABuCh inkubiert. Zur Kontrolle liefen gleiche Ansätze mit Serum ohne Hirnschnitte. Die Ergebnisse sind in Abb. 31 zusammengefasst. Die Abbaugeschwindigkeit ist in den Ansätzen mit Hirnschnitten deutlich vermindert. Daraus kann auf eine gewisse Schutzwirkung des Hirngewebes gegenüber der fermentativen Spaltung von GABuCh durch Serum geschlossen werden.

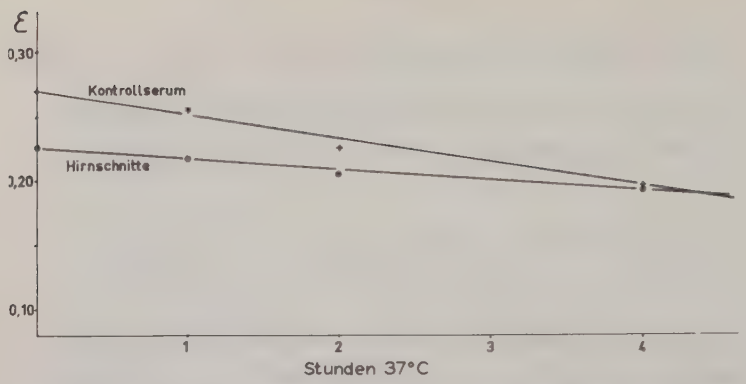



Abbildung 31. Esteratische Wirkung von Rattenhirnschnitten auf GABuCh
.——. Hirnschnitte in Serum +——+ Serum

f) Rattenhirnhomogenat

Gewöhnlich wird bei Versuchen mit Acetylcholinesterasen eine Substratkonzentration von $4 \times 10^{-3}$ Mol/L benutzt, weil die Aktivität des Enzyms bei den höheren und den niedrigeren Konzentrationen wesentlich niedriger ist. Daraus ergibt sich der bekannte glockenförmige Kurvenverlauf, durch den die Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration charakterisiert ist. Falls die GABuCh-Spaltung jedoch durch eine andere Cholinesterase katalysiert wird, die ähnliche Eigenschaften hat, könnte das Substratoptimum bei einer geringeren Konzentration liegen. Die experimentelle Prüfung dieser Frage stösst auf methodische Schwierigkeiten beim quantitativen Nachweis der Spaltprodukte. Eine Möglichkeit bietet die Anwendung von radioaktiv markier-

tem Substrat. Deshalb wurde mit Tritium markiertes GABuCh (s. S. 18) für Untersuchungen mit Hirnhomogenat von Ratten verwendet. Als Puffer diente Ringerlösung folgender Zusammensetzung (76): 9,5 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g CaCl, 0,1 g $NaHCO_3$, 1,0 g Glukose im Liter Wasser gelöst (pH : 7,7). Der Zusatz von markiertem GABuCh erfolgte in 20 µl Wasser zu je 4,0 ml Homogenat oder zu Ringerlösung in dem Kontrollversuch. Die GABuCh-Endkonzentration betrug im ersten Versuch $10^{-5}$ Mol/L. Das Medium war entweder Ringerlösung oder mit Ringerlösung hergestelltes Homogenat. Die Ansätze enthielten verschiedene Mengen Gewebebrei, Verdünnung 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, d.h. 50, 20 oder 10 mg frisches Hirngewebe pro ml Homogenat. Nach der Inkubation wurden die Ansätze, die Hirngewebe enthielten, mit der Methode, wie sie zur Bestimmung von Cholin, GABuCh und ACh auf Seite 49 angegeben ist, extrahiert, die Ansätze mit Ringerlösung im Gefriertrocknungsverfahren zur Trockne gebracht. Nach Aufnehmen der Extrakte oder der Trockenrückstände in 0,2 ml 90%igem Äthanol, erfolgte papierchromatografische Trennung mit Lösungsmittel 3. Die Chromatogramme wurden in 1 cm breite Streifen geschnitten und die Radioaktivität in Toluol Szintillator-Lösung (s. S. 23) im Packard "Tricarb" Flüssigkeitsszintillator gemessen. Eine typische Verteilung von tritiummarkiertem GABuCh und Cholin auf dem Chromatogramm zeigt Abb. 32. Die beiden Maxima entsprechen GABuCh und Cholin.

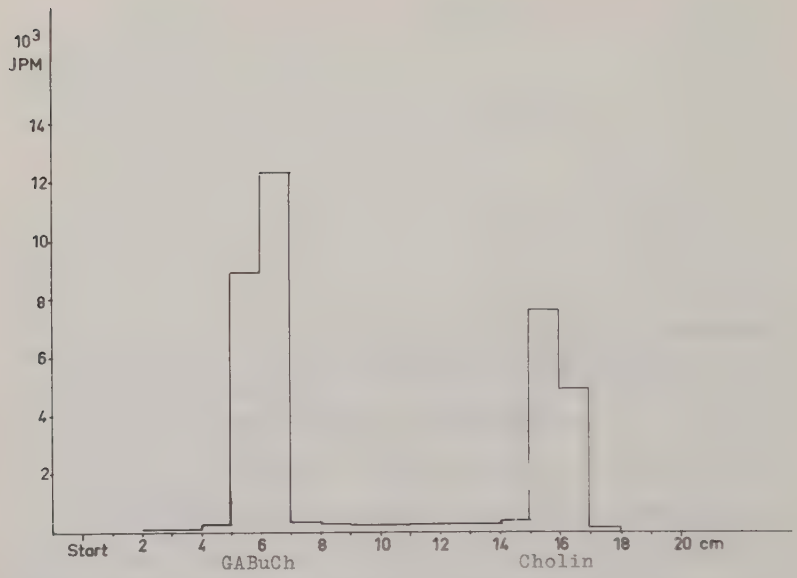



Abbildung 32. Verteilung von tritiummarkiertem GABuCh und Cholin auf einem Chromatogramm (Lösungsmittel 3).

Jede andere Reaktion, die zu einem Derivat führt, müsste sich durch einen dritten radioaktiven Fleck auf dem Chromatogramm bemerkbar machen. In den Versuchen wurde jedoch keine andere Substanz gefunden. Eine Anreicherung von Radioaktivität war nur bei den $R_f$-Werten von Cholin und GABuCh zu beobachten. Die Hydrolyse von GABuCh ist an einem Absinken der Radioaktivität des GABuCh's und einem Anstieg der Aktivität im Cholin zu erkennen. Durch Berechnung der prozentualen Verteilung der Radioaktivität und ihrer Änderung bezogen

auf GABuCh lassen sich Fehler eliminieren, die durch ungenaues Pipettieren oder unvollständige Extraktion wechselnder Quantitäten hervorgerufen werden könnten.

In Abbildung 33 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Auch in kleinen Konzentrationen wird GABuCh durch die im Gehirn vorhandenen Cholinesterasen nicht gespalten. Wiederum ist jedoch eine Schutzwirkung des Hirngewebes für GABuCh vorhanden. Vermutlich ist die "Schutzfunktion" darauf zurückzuführen, dass der pH der schwach basischen Ringerlösung durch Hirngewebe zum schwach sauren verschoben wird (Tabelle 12).

| Homogenat-verdünnung | pH |
|---|---|
| 1 : 10 | 6,8 |
| 1 : 20 | 6,9 |
| 1 : 50 | 7,1 |
| 1 : 100 | 7,2 |
| Ringer | 7,7 |

Tabelle 12. pH-Werte für Ringerlösung mit verschiedenem Zusatz von Rattenhirnhomogenat

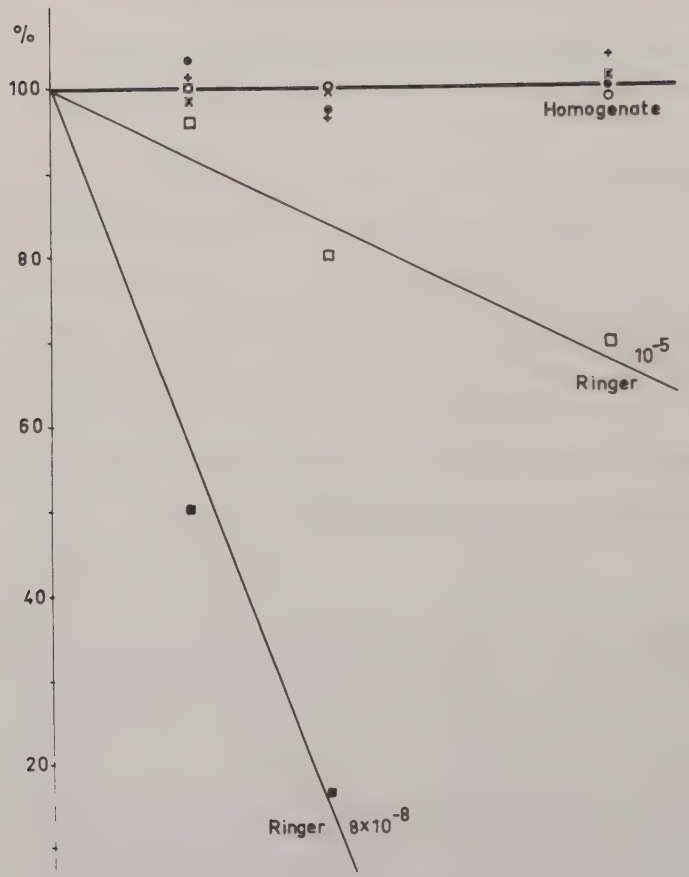
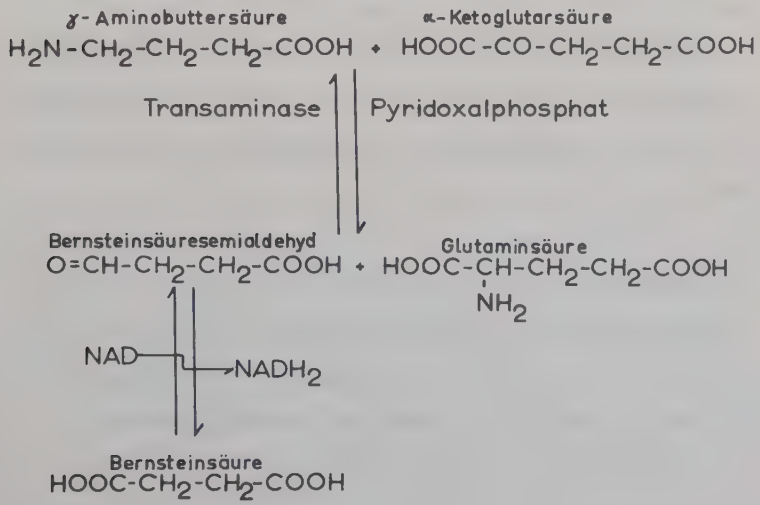



Abbildung 33. Hydrolyse von GABuCh-Methyl-$^{3}$H
Prozentualer Abfall der Radioaktivität im GABuCh bezogen auf Gesamtaktivität

- ▪—▪ Ringerlösung, GABuCh 8 x $10^{-8}$ molar
- ▫—▫ Ringerlösung, GABuCh $10^{-5}$ molar
- \+ —+ Homogenat 1 : 10, GABuCh 8 x $10^{-8}$ molar
- x—x Homogenat 1 : 20, GABuCh $10^{-5}$ molar
- o—o Homogenat 1 : 50, GABuCh $10^{-5}$ molar
- .—. Homogenat 1 : 100, GABuCh $10^{-5}$ molar

3) Versuche mit γ-Aminobuttersäure-α-Ketoglutarsäure Transaminase

Als eine weitere mögliche Reaktion beim Abbau von GABuCh käme ein Verlust der Amino-Gruppe in Frage. Deshalb wurde untersucht, ob eine für γ-Aminobuttersäure spezifische Transaminase auch mit GABuCh reagiert. Das Enzym wurde in Anlehnung an ein von BAXTER und ROBERTS (9) für Rinderhirn ausgearbeitetes Verfahren aus Rattenhirn gewonnen. Dabei handelt es sich um ein partiell gereinigtes, mit Aceton gefälltes Präparat, das die Transaminierungsreaktion zwischen γ-Aminobuttersäure (GABS) und α-Ketoglutarsäure katalysiert. Als Coferment wird Pyridoxalphosphat benötigt. Zweiwertige Metalle müssen gebunden werden, weil sie die Reaktion hemmen, das pH-Optimum liegt bei 8,2. Schematisch lässt sich die Umsetzung folgendermassen darstellen:



Hirne von 20 Ratten (Stamm $E_3$) wurden bei -10° C mit dem zehnfachen Volumen Aceton in einem Multimixgerät homogenisiert, das Homogenat durch eine $G_3$-Glasfritte unter Anlegen eines Vakuums filtriert und mit Aceton gewaschen. Trocknung und Aufbewahrung des Filterrückstandes (Acetontrockenpulver) erfolgte bei Unterdruck von 10 mm Quecksilber mit Silicagel und Paraffinschnitzeln.

Als Enzymlösung wird ein Homogenat von 200 mg Acetontrockenpulver in 10 ml 1/10 molarem Puffer benutzt, der als Chelatbildner für Metalle $10^{-3}$ Mol/L Natrium-Äthylendiamintetraessigsäure enthält. Der Überstand nach dem Zentrifugieren mit 100 000 x g (35 000 U/min in der Spinco-Ultrazentrifuge) wird 5 x 30 min. gegen das hundertfache Volumen Pufferlösung dialysiert. Bei der Herstellung von Enzymlösung ist es notwendig, die Temperatur von 4° C nicht zu überschreiten. Die Messung der Transaminasereaktion kann nach BAXTER und ROBERTS (9) durch die Zunahme von α-Aminosäuren erfolgen. Die bei der Umsetzung entstehende α-Aminosäure ist Glutaminsäure (s. Schema S. 95).

α-Aminosäuren bilden mit zweiwertigem Kupfer Chelate und bringen auf diese Weise Kupfer in Lösung, das mit geeigneten Reagenzien nachgewiesen werden kann. Als Kupferreagenz empfehlen BAXTER und ROBERTS Neocuproin (2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin).

Reagenzien:

1) Kupferphosphataufschwemmung: Die Lösungen von 27,3 g Kupferchlorid pro Liter Wasser, 64,5 g Natriumphosphat pro Liter Wasser und 57,2 g Natriumborat in 2 Liter n/2 Salzsäure werden im Verhältnis 1 : 2 : 2 gemischt. Die entstehende Suspension ist bei $4^{\circ}$ C eine Woche haltbar.
2) Neocuproinlösung: 75 mg Neocuproin werden in 100 ml eines Acetatpuffers pH 5,0 gelöst, der im Liter 57 g wasserfreies Natriumacetat und 17 ml Eisessig enthält.
3) Ascorbinsäure p.A., kristallin.

Verfahren:

3 ml Kupferphosphataufschwemmung und 1 ml der zu analysierenden Lösung werden nach 10 min. Stehen abzentrifugiert, der klare Überstand mit 3 ml Neocuproinlösung und 50 mg Ascorbinsäure versetzt. Nach weiteren 10 min. ist die Reaktion abgeschlossen. Die Messung erfolgt bei 454 nm gegen Wasser. Eine Eichkurve zeigt Abb. 34.

Wegen der Instabilität von GABuCh bei dem im alkalischen liegenden pH-Optimum der Transaminase, erfolgten erste Versuche bei höherer $H^{+}$-Ionenkonzentration. Mit Phosphatpuffer pH 7,15 und pH 7,5 hergestellte Enzymansätze enthielten in 1,4 ml $3 \times 10^{-2}$ Mol α-Ketoglutarat, $3 \times 10^{-2}$ Mol Pyridoxalphosphat und als Substrat

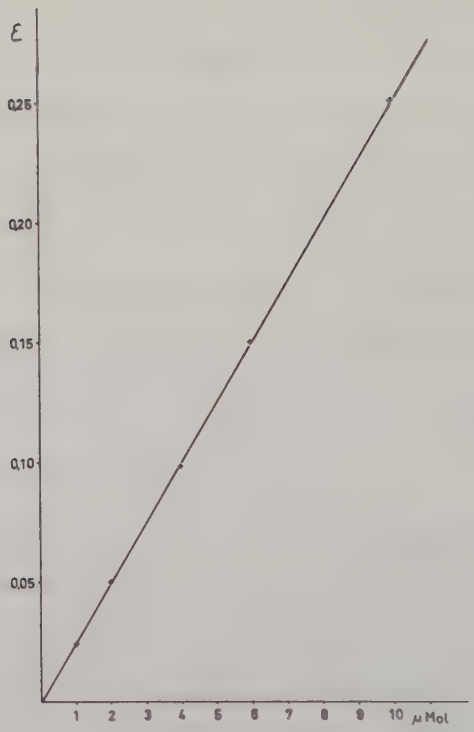



Abbildung 34. Glutaminsäure mit der Methode von BAXTER und ROBERTS zur Bestimmung von α-Aminosäuren

$10^{-2}$ Mol γ-Aminobuttersäure, bzw. $10^{-2}$ Mol. GABuCh. Für mit pH 7,5 angesetzte Inkubationslösung wurde wegen der wesentlich höheren Aktivität des Fermentes bei diesem pH ein zweiter Versuch mit dreifacher Substratkonzentration durchgeführt. Bei jedem Versuch lief zusätzlich

ein Ansatz ohne Substrat mit. Die Reaktionstemperatur betrug 30° C. Vor Beginn der Inkubation sowie nach 90, 180 und 270 min. wurden je 0,2 ml entnommen. Nach Auffüllen auf 1,0 ml erfolgte die Glutaminsäurebestimmung. In Abbildung 35 sind die Messergebnisse zusammengefasst. Die aufgetragenen Werte ergeben sich nach Subtraktion der vor der Inkubation erhaltenen Werte. Bei pH 7,15 transaminiert die Enzymlösung 45 µMol/GABS pro g Hirnfrischgewicht und Stunde und 137 µMol bei pH 7,5. Die Kurve für $10^{-2}$ Mol/L GABS bei pH 7,5 verliert ihre anfängliche Steilheit nach 1,5 Stunden, weil die Substratkonzentration schon zu stark abgenommen hat. Auch in substratfreier Enzymlösung entsteht etwas Glutaminsäure, weil vermutlich in der Enzymlösung Stoffe enthalten sind, die als Substrat dienen können. Diese Reaktion ist ebenfalls pH-abhängig und hat bei pH 7,15 nur etwa die halbe Geschwindigkeit wie bei pH 7,5. Da die Messwerte für GABuCh etwa im gleichen Bereich liegen wie die Werte für Ansätze ohne Substratzusatz, muss geschlossen werden, dass die Aminogruppe des Cholinesters der γ-Aminobuttersäure nicht übertragen wird.

In einer zweiten Reihe von Untersuchungen mit dem gleichen Ferment wurde die Umsetzung durch Bestimmung der Esterkonzentration mit dem modifizierten auf der Hestrin-Methode beruhenden Verfahren verfolgt, mit dem auch die Aminosäureester des Cholins erfasst werden, wäh-

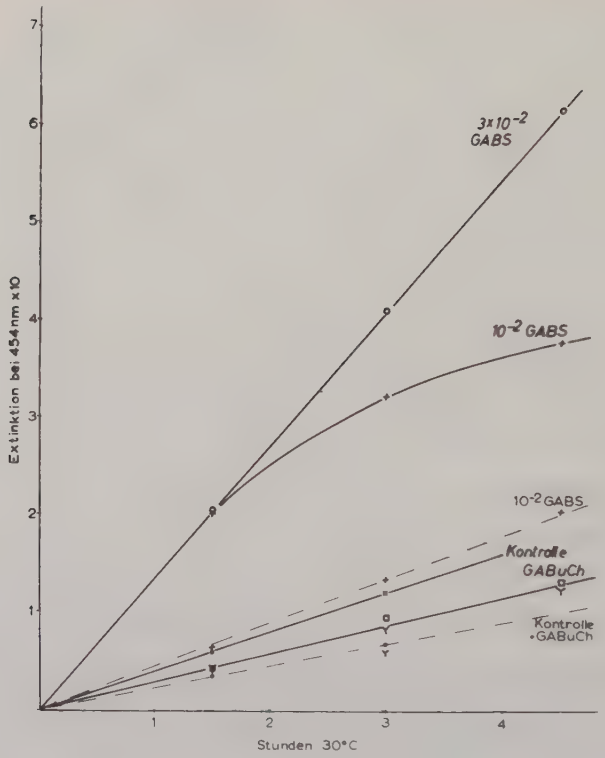



Abbildung 35. γ-Aminobuttersäure - α-Ketoglutarsäure Transaminase
α-Aminosäure-(Glutaminsäure)-Bestimmung

| pH 7,15 | | pH 7,5 | |
|---|---|---|---|
| + - - - + | GABS $10^{-2}$ | o——o | GABS 3 x $10^{-2}$ |
| Y - - - Y | GABuCh $10^{-2}$ | +——+ | GABS $10^{-2}$ |
| . - - - . | Kontrolle ohne Substrat | □——□ | GABuCh 3 x $10^{-2}$ |
| | | Y——Y | GABuCh $10^{-2}$ |
| | | .——. | Kontrolle ohne Substrat |

rend das Originalverfahren nur die Fettsäureester erfasst. Das Endprodukt der Transaminisierungsreaktion mit GABuCh als Donator sollte Succinylmonocholin sein, das mit gleicher molarer Extinktion wie GABuCh in die modifizierte Hestrin-Bestimmung eingeht, aber ebenso wie Acetylcholin auch bei der einfachen Esterbestimmung nach Hestrin reagiert. Folglich müsste bei der üblichen Bestimmung nach Hestrin ein Anstieg der Extinktion eintreten, mit der modifizierten Hestrinmethode dagegen keine Änderung der Extinktion zu messen sein, da für verbrauchtes GABuCh äquimolekulare Mengen Succinylmonocholin entstehen würden.

Mit Phosphatpuffer pH 7,9 hergestellte Enzymlösung enthielt $10^{-2}$ Mol α-Ketoglutarat, $10^{-2}$ Mol GABuCh und $2 \times 10^{-2}$ Mol Pyridoxalphosphat. In einigen Versuchen erfolgte die Dialyse zur Ausschaltung etwaiger Esteraseaktivität gegen Phosphatpuffer dem $10^{-4}$ Mol/L DFP oder Tetraäthylpyrophosphat (TEPP) zugesetzt war. Der Gesamtansatz betrug 2,4 ml. 2 x 0,5 ml wurden zu Beginn der Inkubation, 2 x 0,5 ml nach 2 Stunden Inkubation bei $35^{\circ}$ C entnommen, sofort in 1,5 ml eisgekühltes Wasser pipettiert und bis zur Durchführung der Hestrin-Reaktion in Eiswasser belassen. Zur Kontrolle der spontanen Hydrolyse liefen Ansätze mit, die die genannten Konzentrationen an α-Ketoglutarat, Pyridoxalphosphat und GABuCh in Phosphatpuffer aber kein Enzym enthielten.

Sowohl α-Ketoglutarat, als auch Pyridoxalphosphat verursachen bei der Hestrinbestimmung eine geringfügige Erhöhung der Extinktion.

| Zusätze | enzymfreie Ansätze | | enzymhaltige Ansätze | |
|---|---|---|---|---|
| | Hestrin | modifiz. Hestrin | Hestrin | modifiz. Hestrin |
| - | -43 | -237 | -45 | -231 |
| - | -25 | -255 | -40 | -240 |
| DFP | -67 | -206 | +14 | -187 |
| DFP | -55 | -217 | -45 | -231 |
| TEPP | -24 | -204 | +20 | -184 |

Tabelle 13. GABS-α-Ketoglutarat-Transaminase
Hestrin-Bestimmungen
Angegeben sind die Differenzen zwischen den Werten vor der Inkubation und nach 2-stündiger Inkubation

Mit der Hestrinbestimmung wurde innerhalb von 2 Stunden kein Anstieg der Extinktion gefunden. Bei Anwendung des für Aminosäureester modifizierten Verfahrens trat dagegen stets eine Extinktionsabnahme auf, die in den enzymhaltigen Ansätzen etwa genauso gross war, wie in den en-

zymfreien Kontrollgefässen (Tabelle 13).

Da bei dem für die Versuche verwendeten schwach alkalischen pH-Wert mit einer Hydrolyse von GABuCh gerechnet werden muss (Abb. 23), ist die beobachtete Extinktionsabnahme auf diese Weise zu erklären. Somit ergab sich kein Anhalt dafür, dass GABuCh im Stoffwechsel als Donator für Aminogruppen einer Transaminasereaktion unterliegt, die durch das gleiche Enzym katalysiert wird wie die Übertragung der Aminogruppe von der γ-Aminobuttersäure auf α-Ketoglutarsäure.

F) Untersuchungen zur Synthese von γ-Aminobutyrylcholin im Mäusehirn

Weitere Experimente sollten zur Aufklärung der Biosynthese von GABuCh beitragen. Dafür wurden mögliche Vorstufen eingesetzt, die mit $^{14}C$ radioaktiv markiert waren. Die Identifizierung der Stoffwechselprodukte erfolgte nach papierchromatografischer Trennung durch Autoradiografie.

γ-Aminobuttersäure und Glutamin, die im Kohlenstoffskelett durchgehend markiert waren, wurden verwendet, um zu prüfen, ob daraus der γ-Aminobuttersäureanteil im GABuCh gebildet werden kann. Die spezifische Aktivität

betrug beim Glutamin 2,3 mC/mMol, bei der GABS 2,7 mC/mMol. Ausserdem stand Cholin zur Verfügung,das in den N-Methylgruppen radioaktiven Kohlenstoff enthielt. Die spezifische Aktivität dieser Verbindung betrug 3,58 mC/mMol.

1) Radiomarkierung von γ-Aminobutyrylcholin im Gehirn nach Injektion $^{14}C$-markierter Verbindungen

a) Experimente mit markiertem Glutamin

Wie TSUKADA, HIRANO, NAGATA und MATSUTANI (77) fanden, dringt GABS von der Blutbahn aus schlecht ins Gehirn ein. Dagegen passiert Glutamin die Bluthirnschranke wesentlich besser und wird im Nervengewebe über Glutaminsäure zu GABS umgesetzt (64). Aus diesem Grunde wurden die Untersuchungen mit markiertem Glutamin begonnen.

Eine Maus erhielt 30 µC Glutamin (s. S. 18) in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung je zur Hälfte intravenös und subcutan injiziert. Sie wurde nach 15 min. in Äthernarkose durch Dekapitation getötet, das Gehirn möglichst rasch entnommen und so aufgearbeitet, wie in dem Kapital "Extraktion und Bestimmung der wasserlöslichen niedermolekularen Cholinverbindungen aus dem

Gehirn" auf Seite 49 beschrieben. Jedoch folgte der äthanolischen Extraktion des getrockneten wässrigen Hirnextraktes noch eine Extraktion mit wenigen Tropfen Wasser. Nach der Papierchromatografie in einem Gemisch von 4 Teilen n-Butanol, 1 Teil Essigsäure und 1 Teil Wasser wurden die Streifen für zwei Wochen mit Röntgenfilm in Kontakt belassen. Die dadurch hergestellten Autoradiogramme zeigt Abbildung 36. Die z. T. in einander übergehenden geschwärzten Areale erhielten die Ziffern 1 - 7. Aus dem Vergleich mit den daneben aufgetragenen Testsubstanzen lassen sich schon gewisse Zuordnungen ableiten. Eine genaue Differenzierung konnte jedoch erst nach der Rechromatografie der einzeln aus dem 1. Papierchromatogramm eluierten Substanzen vorgenommen werden (Abb. 38). Der grösste Teil der Radioaktivität befand sich erwartungsgemäss im Glutamin und in seinem Hauptstoffwechselprodukt der Glutaminsäure. Die durch Decarboxylierung der α-Ketoglutarsäure entstehende Bernsteinsäure war stärker markiert als die α-Ketoglutarsäure selbst, die durch Transaminierung von Glutamin oder Glutaminsäure und durch oxydative Desaminierung von Glutaminsäure gebildet werden kann. Etwa die gleiche Menge $^{14}C$ wurde im Glutathion gefunden. Die Decarboxylierung von Glutaminsäure führte zur Markierung der γ-Aminobuttersäure. Wichtig war nun, dass die GABS bei der ersten Chromatografie eindeutig von dem eventuell zu erwartenden GABuCh abge-

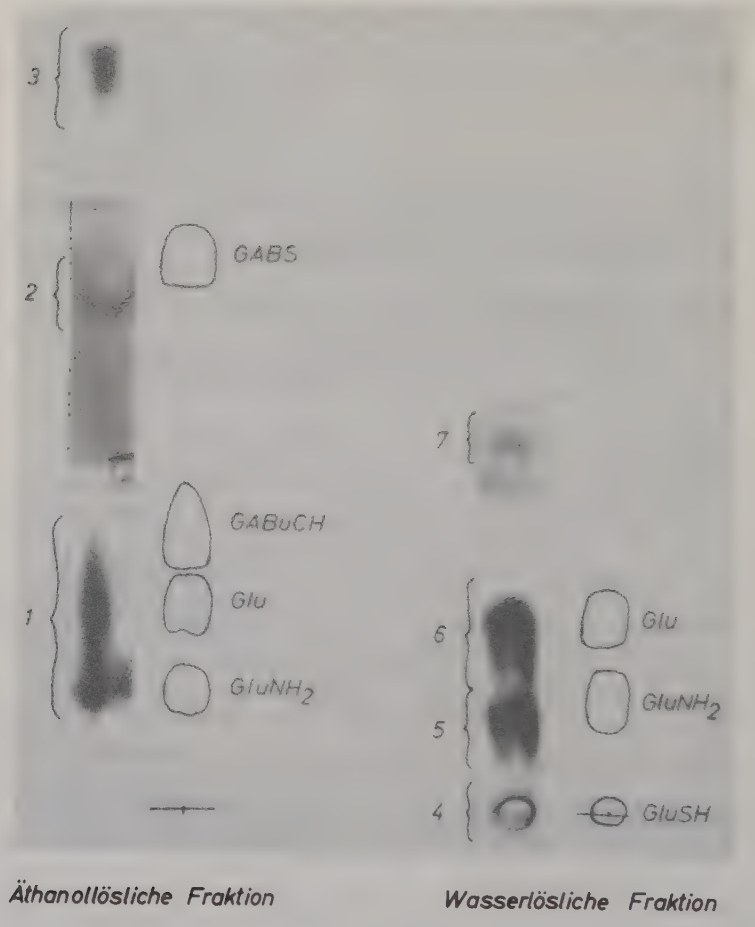



Abbildung 36. Glutamin in vivo - Versuch

links: Autoradiogramme

rechts: Reinsubstanz auf demselben Chromatogramm getrennt; Ninhydrinfärbung

trennt war. Der Ester musste, falls er Bestandteile des markierten Glutamin enthalten sollte, im Areal 1 aufzufinden sein. Die Menge konnte, da nur wenig radioaktive γ-Aminobuttersäure vorhanden war, nur gering sein. Deshalb wurde, um die Identifizierung zu erleichtern und zu verbessern, dem Eluat der Fraktion 1 50 /ug nicht markiertes GABuCh zugesetzt. Dadurch

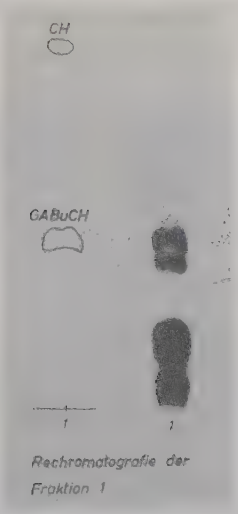



Abbildung 37.

Autoradiogramm und Dragendorff-Anfärbung des Rechromatogramms von Areal 1

liess sich dieser Stoff auch durch eine Farbreaktion mit Dragendorff's-Reagenz auf dem Papier kenntlich machen. So konnte nicht nur der $R_F$-Wert zur Identifizierung herangezogen werden, sondern auch die Form und Ausdehnung des Flecks. Auf Abbildung 37 ist zu sehen, dass einer der auf dem Autoradiogramm geschwärzten

Flecken sich vollständig mit dem angefärbten GABuCh enthaltenden Areal deckt, sodass die Identität zwischen der markierten Substanz und dem angefärbten Stoff als gesichert gelten kann. Ausserdem hatte sich aus der Fraktion 1 noch Glutamin, Glutaminsäure und ein weiterer radioaktiver Stoff abgetrennt, der nicht näher bestimmt wurde. Dabei könnte es sich um das γ-Amid der α-Ketoglutarsäure handeln, das durch Desaminierung von Glutamin entsteht.

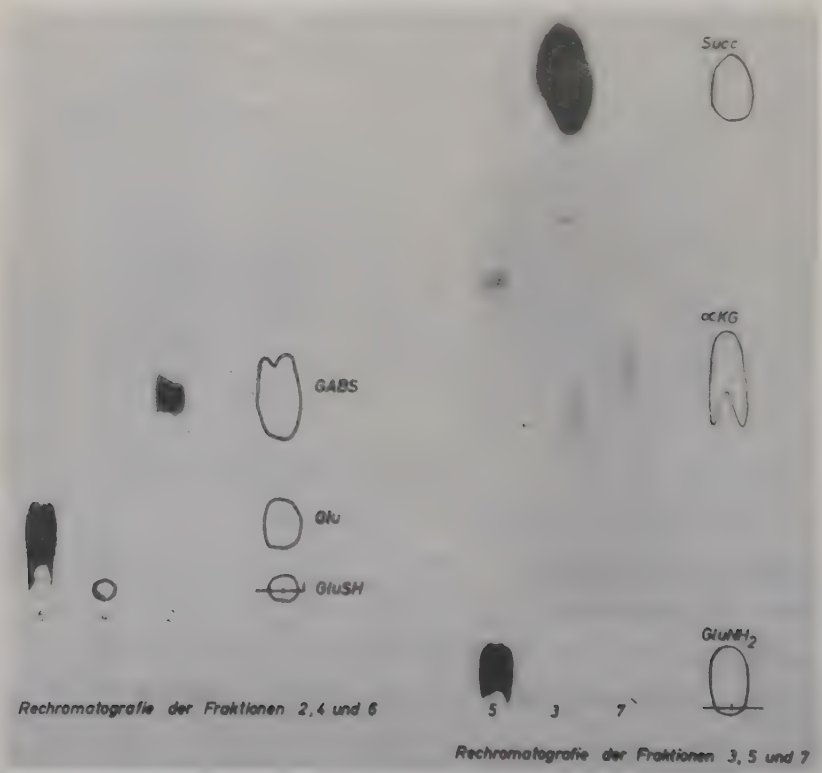



Abbildung 38. Legende siehe Seite - 109 -

Legende zur Abbildung 38.

Autoradiografie der Rechromatogramme 2 - 7. Rechts von den Autoradiogrammen Trennung von Reinsubstanzen auf demselben Chromatogramm. Anfärbung: Ninhydrin bzw. Bromphenolblau (Bernstein- und α-Ketoglutarsäure)

b) Experimente mit markiertem Cholin

Die nächste Frage lautete, ob auch markiertes Cholin in das GABuCh eingebaut werden kann. Dies zu ermitteln wurden 2 mg $^{14}$C-Methyl-Cholin (s. S. 18), deren Radioaktivität 51,2 µC betrug, in 0,3 ml physiologischer Kochsalzlösung einer 20 g schweren Maus sehr langsam intravenös injiziert. Bei schneller Injektion können 2 mg eine Maus bereits töten (26). 15 min. später erfolgte die Dekapitation des Tieres in Äthernarkose. Die Aufarbeitung war die gleiche wie im vorausgegangenen Experiment mit Glutamin.

Zur ersten papierchromatografischen Trennung, die in Lösungsmittel 3 erfolgte, wurde der äthanolische Extrakt halbiert und auf 2 Flecke verteilt. Die zu erwartende GABuCh - Menge pro Fleck wäre so klein gewesen, dass eine Anfärbung mit Dragendorff's-Reagenz nicht möglich gewesen wäre. Deshalb wurde zu einem der Flekke 50 µg nicht markiertes GABuCh zugesetzt, denn im Extrakt wandern die Substanzen häufig doch wesentlich anders als die daneben aufgetragenen Reinsubstanzen.

Das Autoradiogramm und die Anfärbung dieses Streifens sind in Abbildung 39 dargestellt. Deutlich markiert

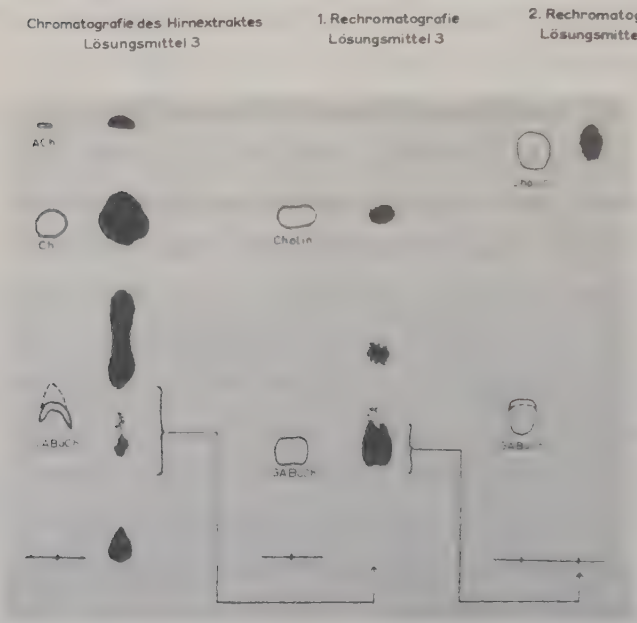



Abbildung 39. Cholin in vivo - Versuch

Links: Autoradiogramm und Dragendorff-Anfärbung desselben Streifens.
Mitte und Rechts: Mit Dragendorff angefärbte Reinsubstanzen jeweils auf demselben Chromatogramm getrennt wie die autoradiografisch dargestellten Trennungen.

sind Cholin und Acetylcholin. Bei diesen Stoffen stimmen die Anfärbungen mit Dragendorff's-Reagenz und die Schwärzungen gut überein. Dagegen ist an der Stelle,

an der nach der Anfärbung GABuCh liegt, keine Schwärzung zu erkennen. Das könnte durch eine für die geringe Aktivität zu geringe Expositionszeit bedingt sein. Das dem GABuCh entsprechende Areal von dem zweiten, nicht angefärbten Streifen wurde daraufhin eluiert und der Rückstand erneut im gleichen Lösungsmittelgemisch chromatografiert. Die Autoradiografie zeigte dann an der Stelle, an der auf dem Vergleichschromatogramm GABuCh lag, eine deutliche Schwärzung (Abb. 39 in der Mitte). Ausserdem zeichnete sich eine kleine Menge Cholin ab. Der GABuCh-Fleck wurde erneut ausgeschnitten, mit Wasser ausgewaschen und der Extrakt zur Chromatografie aufgetragen. Bei dieser Prozedur muss eine weitgehende Spaltung eingetreten sein, denn die Trennung in einem anderen Lösungsmittelgemisch ergab lediglich beim $R_F$-Wert des Cholins eine erkennbare Schwärzung des Films. Somit ist zwar wahrscheinlich, jedoch nicht erwiesen, dass radioaktiv markiertes Cholin zur Synthese von GABuCh verwendet worden ist.

c) Experimente mit markierter γ-Aminobuttersäure

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass das Kohlenstoffgerüst des Glutamins zur Biosynthese von GABuCh verwendet werden kann, musste nun auch untersucht werden, ob die γ-Aminobuttersäure selbst ebenfalls diesen Stoffwechselweg beschreiten kann. Eine 20 g schwere Maus erhielt 50 µC $^{14}$C-γ-Aminobuttersäure (s. S. 18)

in 0,3 ml physiologischer Kochsalzlösung intravenös. Die Zeit bis zur Dekapitation betrug wiederum 15 min. Die Aufarbeitung erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie im Glutamin- und Cholin-Versuch. Dieses Mal schloss sich aber noch eine Fraktionierung über Sephadex-Gel

Abbildung 40. γ-Aminobuttersäure in vivo

Links: Reinstubstanzen in Ninhydrinanfärbung;
Rechts: Autoradiogramme der isolierten Verbindungen.
Beide Trennungen jeweils auf einem Chromatogramm.

(s. S. 21 ff) an. Dabei fand sich die Radioaktivität nur in der Portion, die Prostigmin enthielt. Eine feinere Auftrennung war nicht möglich, sodass die gesamte Fraktion auf einen Fleck zur Chromatografie in Lösungsmittel 1 aufgetragen wurde. Das Autoradiogramm zeigt zwar eine gute Auftrennung, aber im $R_F$-Bereich von GABuCh liegen eine Reihe von markierten Stoffen, die schlecht von einander zu differenzieren sind. Das wesentliche Ziel, nämlich die Trennung der GABS von vermeintlichem GABuCh wurde jedoch erreicht. Im Rechromatogramm der GABuCh-Region im gleichen Lösungsmittel ist keine GABS mehr auszumachen. Das ist für die Deutung der anschliessend durchgeführten Chromatografie des Eluates des GABuCh sehr wesentlich, weil in dem dafür verwendeten Lösungsmittel 3 die $R_F$-Werte von GABS und von GABuCh sehr eng beieinander liegen. Das Ergebnis der Rechromatografie war eine deutlich erkennbare Schwärzung, die genau in der Höhe des GABuCh's lag. Obwohl gleiche $R_F$-Werte in zwei verschiedenen Lösungsmittelgemischen nicht als zwingender Beweis für die Identität zweier Substanzen angesehen werden kann, gehört eine Verschiedenheit der beiden Stoffe doch zu den seltenen Ausnahmen. Mit diesem Vorbehalt darf also angenommen werden, dass die GABS im Gehirn zur Bildung von GABuCh benutzt wird.

2) Die Synthese von γ-Aminobutyrylcholin in Hirnhomogenat

Weitere Aufschlüsse über die Biosynthese von GABuCh sollten aus Versuchen mit Hirnhomogenat gewonnen werden. Dazu wurden Mäusehirne verwendet, die mit dem vierfachen Volumen Pufferlösung hergestellt waren. In Anlehnung an ein von FELDBERG und MANN (23) beschriebenes Verfahren zur Synthese von Acetylcholin enthielten die Ansätze pro ml folgende Zusätze: 1,2 mg KCl, 0,9 mg Cystein, 0,1 mg Eserinsulfat, 0,3 mg $MgSO_4$, 0,08 mg ATP, 1,0 mg Glukose, 0,6 mg Cholin bzw. 0,5 mg Glutamin und die $^{14}C$-markierten Substanzen. In den Inkubationslösungen mit markiertem Cholin und Glutamin war zusätzlich noch 0,1 mg Pyridoxalphosphat zugegeben, um die Desaminierung von Glutamin zu Glutaminsäure und die weitere Decarboxylierung zu GABS zu beschleunigen. Pyridoxalphosphat wird bei beiden Reaktionen als Coferment benötigt.

a) In vitro - Versuche mit Glutamin

2,1 ml Hirnhomogenat wurden mit 15,7 µC Glutamin versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C unter Luft erfolgte Extraktion mit dem beschriebenen Verfahren. Der nach Gefriertrocknung verbliebene Rückstand wurde mehrfach mit 90%igem Äthanol extrahiert und anschliessend mit 0,2 ml Wasser. Die papierchroma-

tografische Trennung erfolgte in dem Lösungsmittel 3. Das nach 24-tägiger Exposition erzielte Autoradiogramm zeigt Abbildung 41. Die fast bandartige Schwärzung liess sich nicht differenzieren. Der mittlere Teil, der durch eine Klammer bezeichnet ist, wurde eluiert und im gleichen Lösungsmittel chromatografiert. Das nach

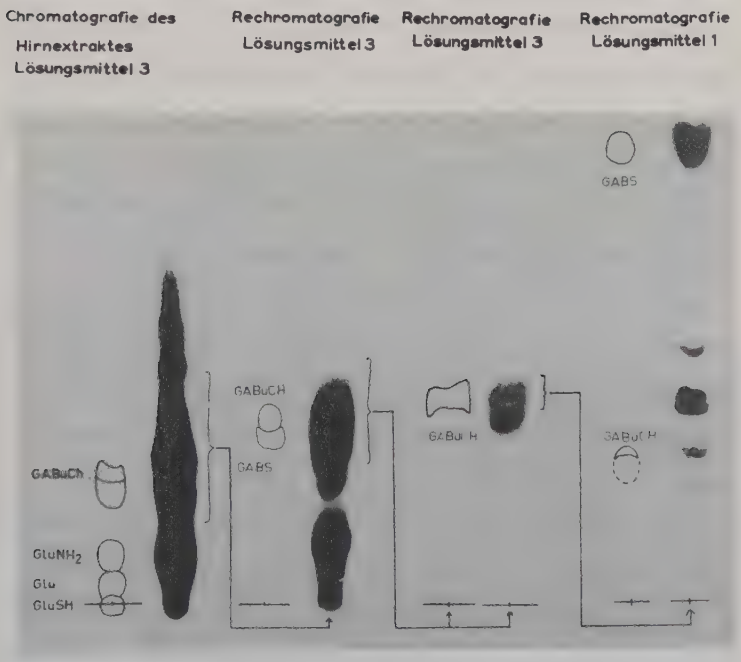



Abbildung 41. Glutamin in vitro - Versuch
Autoradiogramme der aus Homogenat isolierten markierten Verbindungen im Vergleich zu auf gleichen Chromatogrammen getrennten Reinsubstanzen. In einem Fall (2. Rechrom.) Färbung und Autoradiogramm von demselben Streifen.

8-tägiger Exposition erhaltene Autoradiogramm zeigt zwar eine starke Schwärzung im Bereich von GABuCh, die aber in unmittelbarer Nachbarschaft anderer markierter Verbindungen liegt, von denen sie teilweise sogar überlappt wird. Deshalb musste der GABuCh-Abschnitt zum zweiten Male eluiert und zur Hälfte ohne Zusatz, zur anderen Hälfte mit Zusatz von nichtmarkiertem GABuCh chromatografiert werden. Danach fand sich nun eine bis in alle Einzelheiten gehende Übereinstimmung der Flekkenstruktur und Form zwischen der Dragendorff-Anfärbung und dem Schwärzungsareal auf der autoradiografischen Aufnahme. Daraus darf fast ohne Vorbehalt geschlossen werden, dass das mit dem Glutamin zugegebene $^{14}C$ teilweise im GABuCh wiederzufinden ist. Diese Feststellung könnte mit noch grösserer Sicherheit getroffen werden, wenn auch in einem anderen Lösungsmittelgemisch identische $R_F$-Werte festgestellt werden könnten. Deshalb wurde aus dem Chromatogramm des Anteils, der stets gleich behandelt worden war, aber keinen Zusatz von GABuCh enthielt, die GABuCh-Zone ausgewaschen und in Lösungsmittel 1 chromatografiert. Bei der Bearbeitung muss wohl wie schon in einem der vorangegangenen Versuche ein Teil des labilen Esters gespalten worden sein, denn es fand sich eine ziemlich grosse Menge markierter GABS und nur eine schmale Schwärzungszone, die genau den gleichen $R_F$-Wert hat wie die daneben gelaufene Reinsubstanz.

b) In vitro - Versuch mit Cholin

Bei diesen Experimenten war das markierte Glutamin durch inaktives und das inaktive Cholin durch markiertes ersetzt worden. Die Radioaktivität im Ansatz betrug 25 /uC. Extraktion und Aufarbeitung erfolgten in einem ersten Versuch wie bei der Inkubation von markiertem Glutamin beschrieben. Die erste Auftrennung mit Lösungsmittel 3 ist auf Abb. 42 links zu sehen,

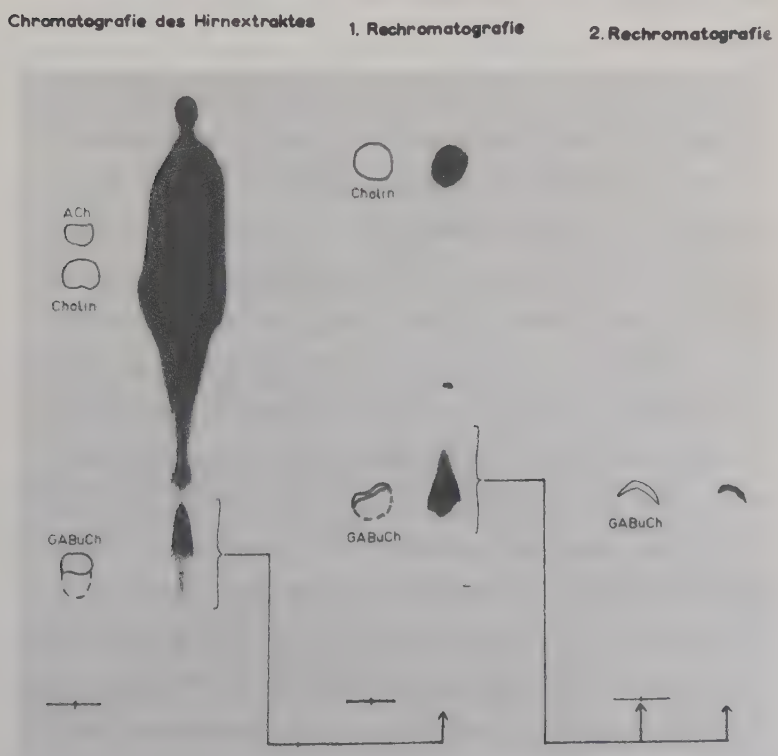



Abbildung 42. Legende siehe Seite - 118 -

Legende zur Abbildung 42.

Cholin in vitro-Versuch
Links und Mitte: Vergleich des Autoradiogramms der isolierten Substanzen mit Reinsubstanzen auf demselben Chromatogramm.
Rechts: Autoradiogramm und Anfärbung desselben Streifens.
Alle Trennungen in Lösungsmittel 3. Dragendorff-Anfärbung.

daneben die Positionen von Reinsubstanzen, die auf dem gleichen Chromatogramm getrennt worden waren. Neben einer sehr starken Schwärzung, die sich über einen recht grossen Bereich erstreckt und Cholin sowie Acetylcholin enthält, sind noch eine Reihe von Schwärzungen zu beobachten, darunter auch Schwärzung im $R_F$-Bereich von GABuCh. Dieser Bereich wurde nach Elution im gleichen Lösungsmittel rechromatografiert (Abb. 42 Mitte). Der grösste Teil der Radioaktivität verbleibt im $R_F$-Bereich von GABuCh, deutlich ist aber auch Cholin auszumachen. Unter Zusatz von nichtmarkiertem GABuCh nochmals im gleichen Lösungsmittel getrennt, ergibt diese Zone ein Chromatogramm, bei dem autoradiografische Schwärzung von Röntgenfilm sich mit der Dragendorff-Anfärbung zur Deckung bringen lässt (Abb. 42 rechts). Wie im letzten Abschnitt betont, ist dies ein sehr starker Hinweis darauf, dass die die Färbung verursachende Substanz mit der radioaktiv markierten identisch ist. Da jedoch alle Trennungen in diesem Versuch nur in einem Lösungsmittelgemisch papierchromatografisch

vorgenommen wurden, erfolgte ein zweiter Versuch unter Benutzung verschiedener Trennverfahren und papierchromatografisch mit zwei Lösungsmitteln. Der wie im ersten Versuch gewonnene Extrakt aus dem Homogenat zeigte nach Durchlauf durch eine Sephadex G-25 Säule (s. S. 21 ff) die auf Abbildung 43 dargestellte Verteilung der Radioaktivität. Zwei Fraktionen wurden gefriergetrocknet und papierchromatografisch in Lösungsmittel 3 getrennt: Der 54. bis 59. ml (Fraktion 1)

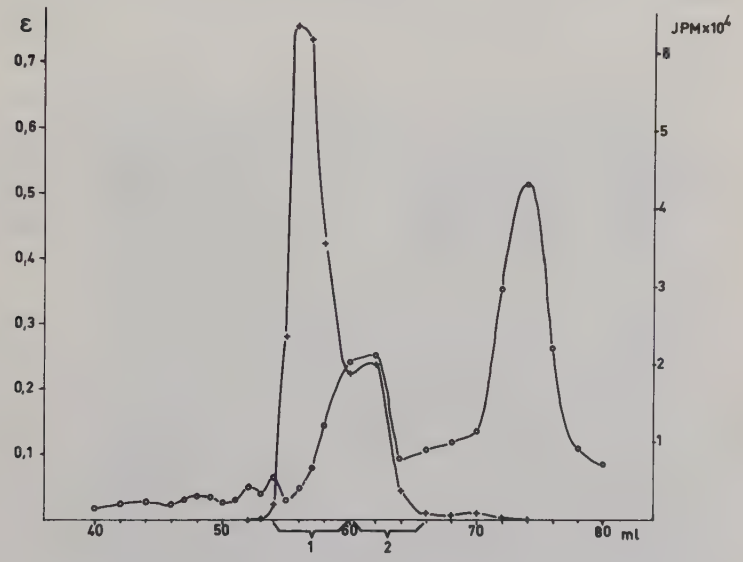



Abbildung 43. Zweiter Cholin in vitro - Versuch
Trennung auf Sephadex G-25.
+ —— + $^{14}$C-Aktivität
o —— o Extinktion bei 260 nm

und der 60. bis 67. ml(Fraktion 2). Wie das Autoradiogramm (Abb. 41 links) zeigt, befindet sich für beide Fraktionen der grösste Anteil der Radioaktivität im Cholin, daneben ist in der Fraktion 2 auch Acetylcholin markiert (Expositionszeit 24 Stunden). In beiden Fraktionen befinden sich unter anderen markierten Substan-

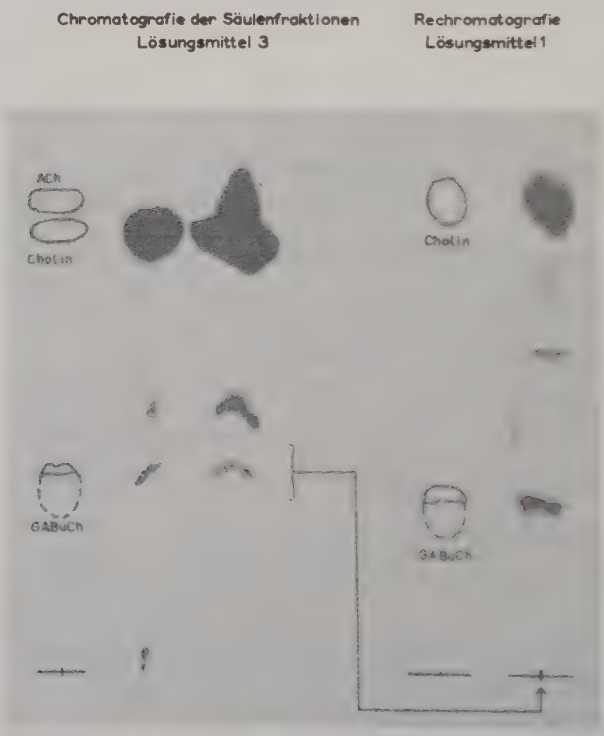



Abbildung 44. Zweiter Cholin in vitro - Versuch
Papierchromatografischer Vergleich isolierter radiomarkierter Substanzen (autoradiograf. Nachweis) mit inaktiven Reinsubstanzen (Dragendorff-Anfärbung)

zen auch solche mit der Laufstrecke von GABuCh. Diese Substanzen wurden gemeinsam eluiert und in Lösungsmittel 1 erneut chromatografiert. Nach einer Exposition von 7 Tagen war das auf der rechten Seite von Abbildung 44 wiedergegebene Autoradiogramm entstanden. Neben markiertem Cholin, das wahrscheinlich durch Spaltung entstanden ist, und einer nicht identifizierten Substanz ist eine Schwärzung mit dem gleichen $R_F$-Wert wie GABuCh zu erkennen. Beide mit Homogenat durchgeführten Versuche sprechen dafür, dass Homogenat von Mäusehirn in der Lage ist, Cholin mit γ-Aminobuttersäure zu verestern.

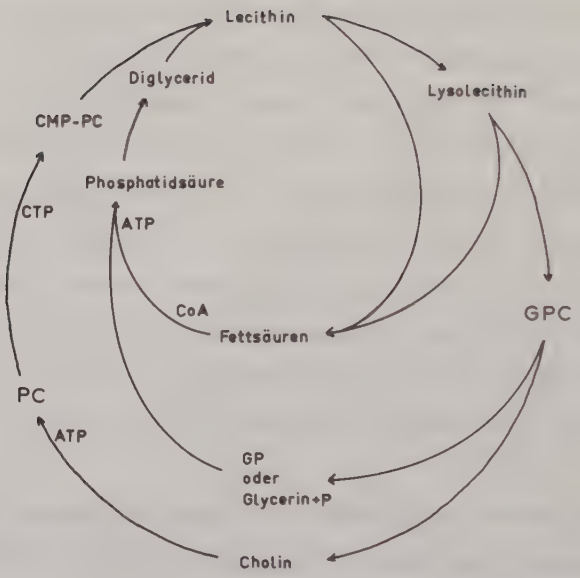
## BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Im wässrigen Extrakt von Rattenhirn wurden 5 cholinhaltige Stoffe gefunden, die sich auf Grund chemischer und physikalisch-chemischer Kriterien als Cholin, Acetylcholin, γ-Aminobutyrylcholin, Phosphorylcholin und Glycerylphosphorylcholin identifizieren liessen. Bei der Extraktion, der Reinigung sowie der Auftrennung und der quantitativen Bestimmung sind einige Faktoren zu beachten, die leicht zu Täuschungen führen können. Manche Angaben in älteren und z. T. auch neueren Arbeiten könnten dadurch bedingt sein.

Die einzige von diesen Substanzen, die ohne vorherige Hydrolyse und Acetylierung Kontraktionen des Froschrectus auslöst, ist Acetylcholin. Cholin und γ-Aminobutyrylcholin wirken zwar auch kontrahierend, aber die notwendigen Konzentrationen sind ca. tausend mal so hoch wie beim Acetylcholin. Bei der Extraktion muss vor allem das Acetylcholin vor der mit grosser Reaktionsgeschwindigkeit wirkenden Acetylcholinesterase geschützt werden. Dazu diente Prostigmin, das dieses Enzym in der angewendeten Konzentration vollständig hemmt. Ausserdem wurde zur Erhöhung der Stabilität der Cholinester bei tiefer Temperatur und im schwach sauren Milieu gearbeitet. γ-Aminobutyrylcholin z. B. zerfällt, wie gezeigt werden konnte, bei 37° C über

pH 7 in einer Stunde vollständig. Für die Papierchromatografie sind nur bestimmte Lösungsmittelgemische geeignet, der Extrakt soll von Lipoiden und Fett möglichst frei sein und die aufgetragene Menge darf nicht zu gross sein, weil sonst leicht Schmiereffekte auftreten und eine scharfe Trennung nicht zu erzielen ist. Möglicherweise hat HOSEIN, der kürzlich in mehreren papierchromatografischen Fraktionen muskelkontrahierende Stoffe fand (36, 37), diese methodischen Voraussetzungen nicht genügend beachtet. Das vermuten auch PEPEU, SCHMIDT und GIARMAN (59), die die Experimente von HOSEIN wiederholten.

Die Reindarstellung von Glycerylphosphorylcholin und Phosphorylcholin aus dem Gehirn war bisher nicht beschrieben, obwohl ihr Vorliegen auf Grund indirekter Schlussfolgerungen angenommen werden konnte (60). Beide Substanzen sind als Zwischenprodukte des Lecithinstoffwechsels anzusehen. Das nebenstehende Schema zeigt, dass Phosphorylcholin über die aktivierte Stufe im Cytidindiphosphatcholin zur Lecithinbildung dient, und Glycerylphosphorylcholin durch die Einwirkung von Phospholipase B auf Lysolecithin als Abbauprodukt anfällt. Nach den in der Literatur mitgeteilten Angaben liegt die Konzentration von PC im Rattenhirn um 0,2 - 0,3 µMol/g (1), nach eigenen Resultaten beträgt der Gehalt an Cholin 0,1 µMol/g, der an GPC 0,56 µMol/g




das Verhältnis GPC : PC : Cholin wäre demnach 5 : 2 : 1.

Auf Grund der Untersuchungen von KOMETIANI (43) und von BERRY und STOTZ (11) kann PC auch für die ohne ATP-Verbrauch verlaufende Synthese von Acetylcholin verwendet werden. Die eigenen Versuche gaben mit Essigsäureanhydrid eine partielle Umesterung von GPC zu Acetylcholin. Es wäre zu prüfen, ob im Gehirn eine gleichartige Reaktion mit Fettsäure oder Aminosäure katalysiert werden kann, für die ebenfalls keine Spal-

tung von ATP erforderlich wäre. Damit wäre der Organismus notfalls im Stande, für die Synthese von Überträgerstoffen eine Vorstufe zu benutzen, in der das Cholin vor dem oxydativen Abbau geschützt ist, die wegen ihrer schlechten Penetration auch nicht sehr rasch die Zelle verlassen kann und die ständig in hohem Überschuss vorliegt. Da die Bildung von Acetylcholin, wie wir wissen, in der Regel auf andere Weise vollzogen wird, könnte es sich bei den beiden erwähnten Mechanismen nur um Nebenwege des Stoffwechsels handeln, die nur dann bedeutsam wären, wenn der Hauptweg nicht funktioniert.

Über den Gehalt an freiem Cholin im Gehirn ist bisher merkwürdiger Weise ausserordentlich wenig bekannt. Frühere Versuche zur Bestimmung von Cholin wurden unter anderen Gesichtspunkten durchgeführt und haben keine zuverlässigen Resultate ergeben. Eine Zusammenfassung der bisherigen Versuche zeigt die Tabelle 14. Die Angabe von FLETCHER, BEST und SOLANDT betrifft das gesamte Cholin, das bei einstündiger Hydrolyse in 5 normaler Salzsäure abgespalten wird. In dem von VINCENT gemessenen Cholingehalt ist GPC teilweise mit enthalten, denn die Werte wurden nach Acetylierung am Froschrectus ermittelt und dabei entsteht durch Umesterung auch aus GPC der Essigsäureester. Bei dem Vorgehen von LUECKE und PEARSON ist das Extraktionsverfahren nicht schonend genug, denn eine minimale Spaltung von Leci-

Tabelle 14.

Bestimmung von Cholin im Hirngewebe

| Untersucher | Cholin /uMol/g | Tierart | Messung | Aufarbeitung |
|---|---|---|---|---|
| Shimizu 1921 (70) | 0,026 | Ochse | gravimetr. als $PtCl_4$ | alkohol. Auszug n. Lipoidextraktion |
| Fletcher et al. 1935 (24) | 26,8 | Ratte | als ACh am Kaninchendarm | Gesamtgewebe $1^h$ m. 5n HCl hydrolysiert |
| Vincent 1939 (78) | 1,0 | Meerschweinchen | Als ACh am Blutegel | |
| Müller 1940 (55) | 0,56 | Mensch | gravimetr. als Pikrat | alkohol. Extrakt d. entfett. Hirn Reineckat-Fällg. |
| Luecke und Pearson 1944 (51) | 1,24 | Ratte | biolog. m. Neurospora crassa Mut. | pH 4,6 $1^h$ 80°C extr. Überst. Acetonfällg. Ionenaust. |
| eigene Resultate | 0,103 | Ratte | als ACh am Froschrectus | saurer Extrakt Fett extrahiert Papierchr. |

thin führt selbstverständlich zu einer erheblichen Zunahme des freien Cholins, da die Konzentrationen der beiden Substanzen sich um mehr als zwei Zehnerpotenzen unterscheiden. Die Ergebnisse von MÜLLER mit menschlichem Gehirn kommen den eigenen Messungen am nächsten. Eventuell haben autolytische Prozesse an dem nicht vollständig frisch zu gewinnenden Material zu einer gewissen Erhöhung der Werte geführt.

Von Interesse sind die Cholinkonzentrationen im Gehirn bei verschiedenen Funktionszuständen des Zentralnervensystems, denn in der Narkose ist die ACh-Konzentration um ca. 60% erhöht (31, 62). Jedoch fand sich bei den hier durchgeführten Analysen keine Veränderung des Cholingehaltes, die den ACh-Anstieg erklären könnten.

Die Bestimmung der Acetylcholin-Konzentrationen im Rattenhirn wurde von zahlreichen Untersuchern vorgenommen. Sie erfolgte immer mit Hirnhomogenat ohne vorherige Isolierung des Esters, sodass eine gleichzeitige Erfassung anderer gleichartig wirkender Substanzen ähnlicher Struktur nicht sicher ausgeschlossen war. Deshalb war eine Wiederholung nach papierchromatografischer Trennung des ACh erforderlich. Die dabei gewonnenen Ergebnisse stimmen erstaunlich gut mit den in der Literatur niedergelegten Werten überein. Die Tabelle 15 gibt die Resultate der anderen Untersucher, die mit Homogenat gearbeitet haben, im Vergleich zu den eigenen wie-

der.

Mit der Isotopenverdünnungsmethode fanden sich um 25% niedrigere Werte. Die Differenz ist wahrscheinlich durch sogenannte Quench-Effekte bedingt, die bei der Ermittlung der Radioaktivität nicht berücksichtigt wurden.

Tabelle 15.

Acetylcholin im Rattenhirn

| Untersucher | ACh | Abweichung v. Eigenergebnis | Lit. |
|---|---|---|---|
| Elliot und Henderson 1951 | 2,65-3,65 | -1% - +36% | 19 |
| Crossland 1951 | 2,7 | + 1 % | 14 |
| Herken und Neubert 1953 | 2,41 | - 10 % | 31 |
| Kovach und Fonyo 1957 | 2,22 | - 17 % | 44 |
| Zeleny et al. 1957 | 2,64 | - 1,5% | 84 |
| Pepeu und Giarman 1960 | 2,77 | + 3 % | 57 |
| Haas und Wulzinger 1960 | 2,69 | + 0,4% | 27 |
| Takahashi et al. 1961 | 2,73 | + 2 % | 74 |
| Pepeu 1963 | 2,8 | + 4,5% | 58 |

Die Konzentration von GABuCh im Rattenhirn beträgt etwa ein Zehntel von der des ACh. Dies mag der Grund sein, weshalb es KEYL (49) nicht gelang, diesen Cholinester zu isolieren. KEYL hatte allerdings sein Augenmerk

auf die Cholinester der niederen Fettsäuren gerichtet. Andere Untersucher wie HENSCHLER (30) oder AUGUSTINSSON (5) fanden den Ester deshalb nicht, weil sie zum Nachweis den Froschrectus verwendeten und die kontrahierende Wirkung von GABuCh am Froschrectus oder anderen muskulären Testobjekten viel geringer ist als die von ACh (13).

Aufschluss über die biochemischen Umsetzungen von GABuCh sollten enzymatische Untersuchungen liefern. Zunächst wurde geprüft, wie die Verbindung abgebaut wird. Die im Zentralnervensystem von Ratten und Tauben vorliegende Acetylcholinesterase katalysiert die Spaltung des Esters nicht. Das gleiche stellten TABACHNICK (73) mit Mäusehirn sowie HOLMSTEDT und SJOEQVIST (34) mit Meerschweinchenhirn fest. Beide Autoren fanden auch keine Spaltung bei der Einwirkung von Acetylcholinesterase aus Rindererythrocyten und aus menschlichen Erythrocyten. Das Cholinester spaltende Enzym, als dessen natürliches Substrat Acetylcholin angesehen wird und dessen Aktivität mit der Funktion des Nervensystems eng verknüpft ist, spielt beim Abbau von γ-Aminobutyrylcholin offenbar keine Rolle.

Anders war es bei den sogenannten Serumcholinesterasen, dessen physiologisches Substrat noch nicht erkannt worden ist. Dieses Ferment katalysiert auch die Hydro-

lyse von GABuCh, allerdings verläuft die Spaltung wesentlich langsamer als die von ACh. Am wirksamsten erwies sich die Cholinesterase aus Taubenserum. In der Tabelle 16 sind die Ergebnisse verschiedener Untersucher an verschiedenen Tierarten zusammengestellt.

Tabelle 16.

GABuCh-Hydrolyse durch Serumcholinesterasen

| Lit. | Untersucher | Spezies | ChE-Typ | Aktivität | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | ACh=100 | BuCh =100 |
| 73 | Tabachnick | Mensch | BuChE | | 10 |
| 34 | Holmstedt u. Sjoeqvist | Mensch | BuChE gereinigt | 9 | 3,6 |
| 73 | Tabachnick | Katze | BuChE | | 0 |
| | vorl.Arbeit | Katze | BuChE | 3 | |
| 73 | Tabachnick | Maus | unbekannt | | 5,5 |
| | vorl.Arbeit | Ratte | PrChE | 5 | |
| | vorl.Arbeit | Taube | unbekannt | 15 | |

Fraglich ist, ob die beobachtete Beschleunigung der Hydrolyse durch Serum als die Wirkung einer Cholinesterase aufgefasst werden kann. Die fehlende Hemmbarkeit durch Eserin und DFP bei der Ratte und bei der Katze spricht gegen eine Beteiligung von Cholinesterasen, die obligat durch diese Stoffe gehemmt werden

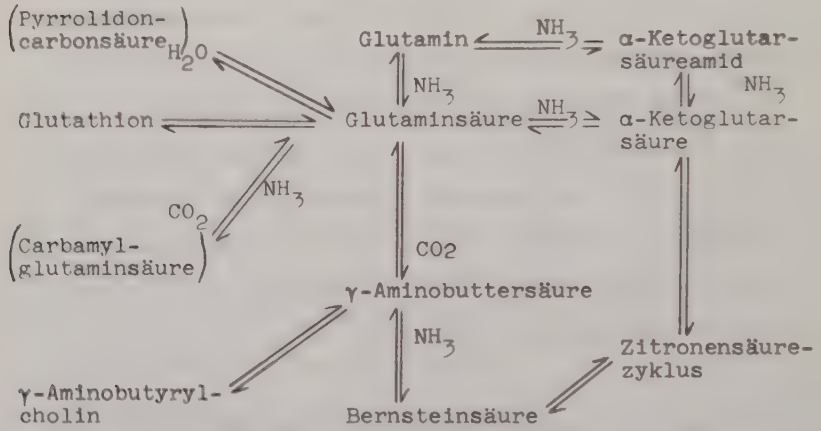
sollten. Bei der Taube ist der Hemmeffekt eindeutig nachweisbar, sodass bei dieser Tierart die Serumcholinesterase so beschaffen sein dürfte, dass sie mit GABuCh in Reaktion treten kann. Die Hemmung dieser Umsetzung durch Cholin ist zu gering und lässt keine eindeutigen Schlüsse auf die Natur des Enzyms zu.

Somit ist der Abbau von GABuCh durch eine spezifische Cholinesterase nicht wahrscheinlich. Falls der Abbau durch eine Spaltung eingeleitet wird, könnte diese nur auf nichtenzymatischem Wege erfolgen, was bei der grossen Labilität des Esters durchaus möglich erscheint. Bereits bei pH-Werten wenig über dem Neutralpunkt, also bei der physiologischen $H^+$-Konzentration, wird GABuCh merklich hydrolysiert.

Ein anderer Abbauweg könnte mit einem Verlust der Amino-Gruppe beginnen. Die Versuche mit einer aus Hirngewebe gewonnenen γ-Aminobuttersäure-α-Ketoglutarat Transaminase ergaben, dass GABuCh diesem Enzym nicht als Substrat dienen kann. Überdies liess sich weder in Hirnhomogenat, noch in Hirnschnitten eine Desaminierung oder ein anders gearteter Abbau von GABuCh nachweisen.

Erfolgreicher als die Untersuchungen über den Abbau waren die Versuche zur Synthese von GABuCh, die mit Hilfe radiomarkierter Vorstufen am lebenden Tier und mit Hirnhomogenaten durchgeführt wurden. Nach der in-

travenösen Applikation der in Frage kommenden Vorstufen Glutamin, γ-Aminobuttersäure oder Cholin fand sich im Gehirn von Mäusen radioaktiv markiertes GABuCh neben den anderen zu erwartenden Produkten. Das nachfolgende Schema zeigt, welche Verbindungen aus Glutamin im Gehirn entstehen können:




Die meisten der in diesem Schema aufgeführten Substanzen waren im Gehirn einer Maus, die $^{14}C$-markiertes Glutamin intravenös erhalten hatte, mit Kohlenstoff-$^{14}$ markiert. Lediglich die in Klammern gesetzten Verbindungen konnten nicht identifiziert werden, da sie nicht als Reinsubstanzen zur Verfügung standen und deshalb nicht mit markierten Verbindungen papierchromatografisch verglichen werden konnten. Die gleichen Resultate ergaben sich bei in-vitro-Versuchen mit

Hirnhomogenat.

Über den Mechanismus,durch den die Bildung zustande kommt, geben die Versuche keine Auskunft. Sie bestätigen jedoch, dass GABuCh nicht nur ein Kunstprodukt ist, sondern tatsächlich im Stoffwechsel entsteht. So wäre zu diskutieren, ob es sich um ein bedeutungsloses Nebenprodukt handelt, das in kleinen Mengen mit Hilfe von Enzymen entsteht deren Hauptaufgabe z. B. die Synthese von Acetylcholin ist. Falls derartige ungezielte Reaktionen im Gehirn möglich sind, sollten eigentlich in erster Linie eine ganze Reihe von Cholinestern mit den Karbonsäuren gebildet werden, die in viel grösseren Mengen anfallen. Da das Zentralnervensystem seinen Energiebedarf vorwiegend aus dem Kohlenhydratabbau deckt, entsteht relativ viel Brenztraubensäure, Milchsäure und ausserdem sollten Buttersäure und Propionsäure aus dem Abbau der Fette und der Aminosäuren vorhanden sein. Obwohl auch verschiedene andere Untersucher wiederholt und sorgfältig nach den Cholinestern dieser Säuren gesucht haben, wurde keiner von ihnen im Gehirn entdeckt. Lediglich in der Milz fand sich nur bei einer Spezies, nämlich beim Rind, Propionylcholin (8). Zudem ist die γ-Aminobuttersäure ein Inhaltsstoff des Gehirns, der in anderen Organen nicht vorkommt. Die für den Stoffwechsel von γ-Aminobuttersäure erforderlichen Enzyme gibt es ebenfalls nur im Gehirn, sodass eine Bedeutung für eine der cha-

rakteristischen Hirnfunktionen schwerlich von der Hand zu weisen ist. Bis jetzt ist allerdings nicht bekannt, in welcher Form und bei welcher Tätigkeit das Gehirn γ-Aminobuttersäure benötigt.

ZUSAMMENFASSUNG

Extraktions- und Bestimmungsverfahren für die quantitative Analyse der wasserlöslichen, niedermolekularen Cholinverbindungen wurden geprüft. Es werden Methoden zur Bestimmung aller im Gehirn vorkommender Cholinester nebeneinander beschrieben, die Extraktion, Chromatografie an Dextrangel, Papierchromatografie und kolorimetrische oder biologische Messungen einschliessen.

Ausser freiem Cholin enthält Rattengehirn an wasserlöslichen niedermolekularen Cholinverbindungen Acetylcholin, γ-Aminobutyrylcholin, Phosphorylcholin und Glycerylphosphorylcholin. Phosphorylcholin und Glycerylphosphorylcholin wurden anhand papierchromatografischer und chemischer Methoden sowie Infrarotabsorptionsspektren identifiziert. Andere niedermolekulare, wasserlösliche Verbindungen mit einer Acetylcholin ähnlichen Wirkung auf die Froschmuskelpräparation lassen sich in Rattengehirn nicht nachweisen.

Die für den Nachweis und die Bestimmung von Glycerylphosphorylcholin wichtige Eigenschaft mit Acetanhydrid zu Acetylcholin umzuestern, wurde erkannt.

Der Gehalt an Cholin, Acetylcholin und γ-Aminobutyrylcholin im Rattengehirn wurde nach papierchromato-

grafischer Reinigung gemessen. Die gefundenen Werte für Acetylcholin entsprechen mit 2,68 µg/g den in der Literatur angegebenen Konzentrationen, die ohne Reinigung gefunden wurden. Mit 15 µg/g wurde für Cholin ein niedrigerer Gehalt festgestellt als in der Literatur angegeben. γ-Aminobutyrylcholin ist mit 0,37 µg/g nur in sehr geringen Mengen im Rattenhirn vorhanden. Der Gehalt an Glycerylphosphorylcholin wurde mit 143 µg/g bestimmt.

Die Spaltbarkeit von γ-Aminobutyrylcholin durch Esterasen aus Ratten-, Katzen- und Taubenplasma ist gering. In Hirngewebe vorkommende Acetylcholinesterasen beschleunigen die Verseifung von γ-Aminobutyrylcholin nicht. Auch für die γ-Aminobutyrat-α-Ketoglutarat-Transaminase dient dieser Ester nicht als Substrat. Da bei pH-Werten wenig oberhalb des Neutralpunktes γ-Aminobutyrylcholin spontan zerfällt, wäre ein nichtenzymatischer Abbau im lebenden Gewebe gut denkbar.

In Mäusegehirn befindet sich nach intravenöser Applikation von $^{14}C$-markiertem Glutamin oder mit dem gleichen Radioisotop markierter γ-Aminobuttersäure radioaktiv markiertes γ-Aminobutyrylcholin. In Homogenat von Mäusehirn ist als Glutamin oder Cholin zugesetztes $^{14}C$ nach Inkubation als γ-Aminobutyrylcholin wiederzufinden. Damit ist sichergestellt, dass Mäusehirn γ-Aminobutyrylcholin synthetisiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. G. B. ANSELL und S. SPANNER: J. Neurochem. 9, 253 (1962)
2. H. D. APPLETON, B. N. LaDu jr., B. B. LEVY, J. M. STEELE und B. B. BRODIE: J. Biol. Chem. 205, 803 (1953)
3. M. ASANO, T. NORO und K. KURIAKI: Nature 185, 848 (1960)
4. K. - B. AUGUSTINSSON und M. GRAHN: Acta chem. scand. 7, 906 (1953)
5. K. - B. AUGUSTINSSON und M. GRAHN: Acta physiol. scand. 32, 174 (1954)
6. L. v. BABO und M. HIRSCHBRUNN: Justus Liebigs Ann. Chem. 84, 10 (1952)
7. E. BAER und M. KATES: J. Amer. Chem. Soc. 70, 1394 (1948)
8. R. J. BANISTER, V. P. WHITTAKER und S. WIJESUNDRA: Z. Physiol. 115, 55 P (1951)
9. C. F. BAXTER und E. ROBERTS: J. Biol. Chem. 233, 1135 (1958)
10. J. BERENBLUM und E. CHAIN: Biochem. J. 32, 286, 295 (1938)
11. J. F. BERRY und E. STOTZ: J. Biol. Chem. 218, 871 (1956)

12. C. J. F. BÖTTCHER, C. PRIES und C. M. van GENT: Rec. Trav. Chim. Pays-Bas: 80, 1169 (1961)

13. J. BUSS: Inaug. Diss. Med. Fak. Freie Universität Berlin 1963

14. J. CROSSLAND: J. Physiol. 114, 318 (1951)

15. D. R. CURTIS, I. W. PHILLIS und J. C. WATKINS: J. Physiol. 158, 296 (1961)

16. H. H. DALE und H. W. DUDLEY: J. Physiol. 68, 97 (1929)

17. R. M. C. DAWSON: Biochem. Biophys. Acta 14, 374 (1954)

18. R. M. C. DAWSON: Biochem. J. 62, 689 (1956)

19. K. A. C. ELLIOT und N. HENDERSON: Amer. J. Physiol. 165, 365 (1951)

20. V. ERSPAMER und F. DORDONI: Arch. int. Pharmacodyn. 74, 263 (1947)

21. V. ERSPAMER und O. BENATI: Biochem. Zeitschr. 324, 66 (1953)

22. A. J. EWINS: Biochem. J. 8, 44 (1914)

23. W. FELDBERG und T. MANN: J. Physiol. 104, 411 (1946)

24. J. P. FLETCHER, C. H. BEST und O. M. SOLANDT: Biochem. J. 29, 2278 (1935)

25. E. FOURNEAU und H. J. PAGE: Bull. Soc. Chim. Fr. (4) 15, 544 (1914)

26. K. GREEFF, E. WESTERMANN und G. BOHNÉ: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmak. 228, 481 (1956)

27. M. HAAS und H. WULZINGER: Arch. int. Pharmacodyn. 128, 239 (1960)

28. S. M. HAIS und K. MACEK: Handbuch der Papierchromatografie, Jena, 1958 Band I, 732, 736

29. M. HAYASHI, T. UNEMOTO und K. MIYAKI: Chem. Pharm. Bull.(Tokyo) 10, 533 (1962)

30. D. HENSCHLER: Hoppe-Seylers Zeitschr. physiol. Chem. 305, 97 (1956)

31. H. HERKEN und D. NEUBERT: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmak. 237, 223 (1953)

32. S. HESTRIN: J. Biol. Chem. 180, 249 (1949)

33. HOPPE-SEYLER/THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse (Herausgeber: K. LANG und E. LEHNARTZ), Berlin 1955, Band II, 779, Band III, 159, 1131 ff

34. B. HOLMSTEDT und F. SJOEQVIST: Biochem. Pharmacol. 3, 297 (1960)

35. N. H. HOROWITZ und B. BEADLE: J. Biol. Chem. 150, 325 (1943)

36. E. A. HOSEIN und P. PROULX: Nature 187, 321 (1960)

37. E. A. HOSEIN, P. PROULX und R. ARA: Biochem. J. 83, 341 (1961)

38. R. HUNT und R. de M TAVEAU: Bull. U. S. Publ. Hlth. Service (Hyg. Lab.) No. 73, Washington 1911

39. B. KAKÁC und Z. J. VEJDELEK: Handbuch der Kolorimetrie, Jena, 1963, Band II 141 f, 480 ff, 899

40. H. KEWITZ: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 237, 308 (1959)

41. H. KEWITZ: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 240, 16 (1960)

42. M. J. KEYL: Ph. D. Dissertation, University of Cincinnati 1957 zit. nach 79

43. P. A. KOMETIANI: Biokhimija 17, 108 (1952) zit. nach Ber. Ges. Biol. Abtlg. B 157, 25 (1953)

44. A. G. B. KOVACH und A. FONYO: Acta Physiol. Hung. 13, 1 (1957)

45. O. KRAUPP und G. PAUMGARTNER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 243, 508 (1962)

46. K. KURIAKI , T. YAKUSHIJI, T. NORO, T. SHIMIZU und Sh. SAJI: Nature 181, 1336 (1958)

47. J. W. Le HEUX: Pflügers. Arch. Ges. Physiol. 173, 8 (1918); ibid. 179, 177 (1920); ibid. 190, 301 (1921)

48. O. LOEWI: Pflügers. Arch. Ges. Physiol. 189, 239 (1921); ibid. 193, 201 (1921)

49. I. P. LOWE, E. ROBINS und G. S. EYERMAN: J. Neurochem. 3, 8 (1958)

50. O. H. LOWRY, N.R. ROBERTS, K. Y. LEINER, M.-L. WU und A. L. FARR: J. Biol. Chem. 207, 1 (1954)

51. R. W. LUECKE und P. B. PEARSON: J. Biol. Chem. 155, 507 (1944)

52. P. MARQUARDT und C. VOGG: Hoppe-Seylers Zeitschr. physiol. Chem. 291, 143 (1952)

53. H. Mc LENNAN: J. Physiol. 146, 358 (1959)

54. O. MIQUEL: J. Pharmacol. 88, 67 (1946)

55. E. MÜLLER: Z. Biol. 100, 315 (1940)

56. A. OURY und Z. M. BACQ: Arch. int. Physiol. 47, 92 (1938)

57. G. PEPEU und N. J. GIARMAN: Nature 186, 638 (1960)

58. G. PEPEU: Nature 200, 895 (1963)

59. G. PEPEU, K. F. SCHMIDT und N. J. GIARMAN: Biochem. Pharmacol. 12, 385 (1963)

60. G. PORCELLATI: J. Neurochem. 2, 128 (1958)

61. H. M. RAUEN: Biochem. Taschenbuch, Berlin 1964, Band I, 217; Band II, 89 ff, 217

62. D. RICHTER und J. CROSSLAND: Amer. J. Physiol. 159, 247 (1949)

63. O. RIESSER und S. M. NEUSCHLOSS: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 91, 342 (1921)

64. E. ROBERTS: Inhibition in the nervous system and γ-aminobutyric acid (Herausgeber: E. ROBERTS und G. BAX-

TER), New York, 1959, 144

65. J. SCHAEFER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 236, 483 (1959)

66. H. SCHIMASSEK, G. KOHL und Th. BÜCHER: Biochem. Zeitschr. 331, 87 (1959)

67. G. SCHMIDT, L. HECHT, P. FALLOT, L. M. GREENBAUM und S. J. THANNHAUSER: J. Biol. Chem. 197, 601 (1952)

68. G. SCHMIDT, L. M. GREENBAUM, P. FALLOT, A. C. WALKER und S. J. THANNHAUSER: J. Biol. Chem. 212, 887 (1955)

69. P. SCHWARZE: Naturwiss. 36, 88 (1949)

70. T. SHIMIZU: Biochem. Zeitschr. 117, 252 (1921)

71. G. F. SMITH und W. H. CURDY: Analyt. Chem. 24, 371 (1952)

72. J. C. STRECKER: Justus Liebigs Ann. Chem. 123, 353 (1862)

73. J. J. A. TABACHNICK: Biochem. Pharmacol. 3, 166 (1960)

74. R. TAKAHASHI, T. NASU, T. TAMURA und T. KARIYA: J. Neurochem. 7, 103 (1961)

75. H. TAKAHASHI, A. NAYASHIMA und Ch. KOSHINO: Nature 182, 1443 (1958)

76. L. THER: Pharmakolog. Methoden, Stuttgart (1949) 51

77. Y. TSUKADA, S. HIRANO, Y. NAGATA und T. MATSUTANI:

Inhibition in the nervous system and γ-aminobutyric acid (Herausgeber: E. ROBERTS u. C. F. BAXTER) 163

78. C. VINCENT: Bull. Soc. Chim. Biol. 21, 446 (1938)
79. L. VORIS, G. ELLIS und L. A. MAYNARD: J. Biol. Chem. 133, 491 (1940)
80. E. WEBER: Grundriss der biolog. Statistik, Jena, 186 f (1956)
81. V. P. WHITTAKER: Biochem. J. 66, 35 P (1957)
82. V. P. WHITTAKER: Biochem. Pharmacol. 1, 342 (1959)
83. V. P. WHITTAKER: Heffters Handbuch der experiment. Pharmakologie Erg. Band XV "Cholinesterases and anticholinesterase agents" (Herausgeber: G. B. KOELLE) 21 ff
84. A. ZELENY, V. LINDAUR und J. KOZAK: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 231, 593 (1957)

Herrn Prof. Dr. med. H. Herken, Direktor des Pharmakologischen Institutes der Freien Universität Berlin, besonders herzlich auch Herrn Prof. Dr. med. H. Kewitz, Leiter der Abteilung Pharmakologie des Institutes für Veterinär-Pharmakologie der Freien Universität Berlin danke ich für die Bereitstellung von Arbeitsplätzen und für ihre grosszügige Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Lebenslauf:

Am 17. März 1933 wurde ich, Karl, Paul, Adolf Dross, Sohn des Pfarrers Karl Dross und seiner Ehefrau Eva, geb. Herrlitz in Schwersenz, Kreis Posen, geboren.

Seit 1939 besuchte ich die Volksschule im Bromberg und seit 1943 die Oberschule in Bromberg, Ballenstedt a. Harz, Northeim/Hannover und Dortmund. Am 26. Februar 1953 bestand ich in Dortmund die Reifeprüfung.

Nach zweijähriger Praktikantenzeit in der Glückauf-Apotheke in Brambauer in Westfalen bestand ich am 29. März 1955 die Pharmazeutische Vorprüfung in Arnsberg.

Ab Sommersemester 1955 studierte ich an der Bonner Universität Pharmazie, wo ich am 29. Oktober 1959 die Pharmazeutische Prüfung bestand. Von November 1959 - April 1960 war ich als Kandidat der Pharmazie in der Stern-Apotheke in Dortmund tätig.

Im Mai 1960 begann ich mit wissenschaftlichen Arbeiten am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin. Diese setzte ich ab 1. September 1962 in der Abteilung Pharmakologie des Institutes für Veterinär-Pharmakologie der Freien Universität Berlin fort, wo

ich seit der gleichen Zeit mit der Wahrnehmung der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten beauftragt bin.

Mit Geltung zum 8. November 1960 erhielt ich die Bestallung zum Apotheker.

Photodruck der Photo Copie GmbH.